



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

DEB - Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche

Dottorato in Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche
XXIV ciclo

**“Studio delle comunità microbiche in sedimenti di ecosistemi fluviali temporanei:
l'effetto delle diverse fasi idrologiche sul flusso dei nutrienti e sul destino dei
microinquinanti organici”**

(SSD BIO/07)

Coordinatore: Dott.ssa Roberta Cimmaruta

Tutor: Dott.ssa Annamaria Zoppini

Dottoranda: Dott.ssa Patrizia Casella

La presente tesi è stata svolta dal Dott.ssa Patrizia Casella nel periodo Gennaio 2009 – Dicembre 2011, presso l'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche, nell'ambito delle attività di ricerca svolte dal gruppo di Ecologia Microbica.

Il lavoro sperimentale e la stesura della tesi sono stati supervisionati dalla Dott.ssa Annamaria Zoppini.

Consegna della Tesi di Dottorato: 02 Marzo 2012

Discussione della Tesi di Dottorato: 20 Marzo 2012

INDICE

RIASSUNTO	I
SUMMARY	IV
 1 INTRODUZIONE	 1
1.1 Ecosistema fluviale	1
1.2 Il ciclo dei nutrienti	3
1.3 Le comunità microbiche	10
1.3.1 Principali fattori che influenzano l'attività delle comunità microbiche	11
1.3.2 Ruolo delle comunità microbiche nei flussi di carbonio	13
1.3.3 Ruolo delle comunità microbiche nei sedimenti	14
1.4 I fiumi temporanei	16
1.5 I microinquinanti ed il quadro normativo	19
1.5.1 Gli idrocarburi policiclici aromatici (PAH)	22
1.5.1.1 La degradazione dei PAH	23
1.5.2 Il nonilfenolo	25
1.5.2.1 La degradazione del nonilfenolo	26
1.6 Obiettivo del lavoro	27
 2 MATERIALI E METODI	 30
2.1 Descrizione del sito di studio: il bacino idrografico del fiume Candelaro	30
2.2 Campionamento	32
2.3 Caratteristiche del sedimento	34
2.3.1 Analisi granulometrica	34
2.3.2 Peso secco	34
2.3.3 Analisi chimiche	34
2.4 Analisi effettuate sulla comunità microbica bentonica	36
2.4.1 Misura delle abbondanze batteriche	36
2.4.2 Misura del numero di spore	39
2.4.3 Stima della biomassa totale vivente (ATP)	40
2.4.4 Stima della produzione procariotica di carbonio (PCP)	43
2.4.5 Stima dei tassi di respirazione della comunità microbica	46
2.4.5.1 Descrizione del metodo con camere di incubazione	47
2.4.5.2 Descrizione del metodo biochimico (ETS)	48
2.4.5.3 Ottimizzazione delle misure del metodo biochimico	50
2.4.6 Attività enzimatiche extracellulari	53
2.4.7 Procedura per la marcatura dei siti attivi per l'attività extracellulare della fosfatasi alcalina (ELF)	57
2.5 Allestimento dei microcosmi	58
2.5.1 Esperimento di reidratazione del sedimento secco	58
2.5.2 Esperimento di degradazione dei PAH	59
2.6 Analisi statistica	60
 3 RISULTATI	 61
3.1 Caratterizzazione del sito di studio	61
3.1.2 Concentrazione di microinquinanti nei sedimenti	64
3.1.3 Caratteristiche strutturali e funzionali della comunità microbica del sedimento	66

3.2 Studio degli effetti dell'alternanza di condizioni idrologiche sulle comunità microbiche del sedimento	69
3.3 Studio dell'interazione tra microinquinanti e le comunità microbiche del sedimento	73
3.3.1 Variazione della concentrazione dei microinquinanti.....	73
3.3.2 Variazione dei parametri strutturali e funzionali della comunità microbica	75
4 DISCUSSIONE	78
4.1 Il sito di studio e i microinquinanti	78
4.2 La risposta delle comunità microbiche alla variazione dei fattori ambientali	81
4.3 Stima dei flussi di carbonio <i>in situ</i>	85
4.4 Effetti della siccità	87
4.5 Effetto e destino dei microinquinanti.....	90
5 CONCLUSIONI	96
BIBLIOGRAFIA	98

RIASSUNTO

Nelle regioni semi-aride del pianeta i fiumi temporanei vanno incontro a ricorrenti periodi di siccità che variano in estensione e durata. Questi ecosistemi, caratterizzati da una elevata instabilità, stanno andando incontro ad una estensione della durata e della frequenza degli eventi estremi in conseguenza del cambiamento climatico. Nonostante i fiumi temporanei rappresentino un'importante risorsa idrica per le popolazioni locali, sono stati a lungo ignorati nei piani di monitoraggio perché creduti “biologicamente inattivi” durante il periodo di siccità. Scarse sono ad oggi le informazioni relative a questi ecosistemi.

Questa Borsa di Dottorato è stata finanziata dal Progetto Europeo MIRAGE (Mediterranean Intermittent River ManAGEment, FP7-ENV-2007-1, GA 211732, 2009-2011) ed è stata svolta presso il Laboratorio di Ecologia Microbica dell'Istituto di Ricerca Sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR, Roma). L'obiettivo del Progetto MIRAGE è stato quello di acquisire specifiche conoscenze per una migliore valutazione dell'integrità ecologica dei fiumi temporanei dell'area Mediterranea. In particolare questa tesi ha riguardato lo studio degli effetti di condizioni estreme (siccità/piene) sulla struttura e la funzione delle comunità microbiche bentoniche in condizioni naturali e in condizioni di laboratorio, così come le interazioni tra le comunità microbiche e le sostanze pericolose.

Le comunità microbiche del sedimento svolgono un ruolo importante nella degradazione della sostanza organica favorendo il trasferimento di energia ai livelli superiori della catena trofica basata sul detrito. Nei fiumi temporanei l'alternarsi di condizioni idrologiche estreme può compromettere il buon funzionamento dei processi di degradazione mediati dalle comunità microbiche e quindi anche il destino degli inquinanti nell'ambiente, con importanti ripercussioni sul funzionamento generale dell'ecosistema.

Le proprietà strutturali e funzionali delle comunità microbiche del sedimento del fiume Candelaro (Italia meridionale) in diverse fasi idrologiche sono state caratterizzate in studi di campo, e di laboratorio, attraverso la misura dell'abbondanza batterica (colorazione DAPI, microscopia ad epifluorescenza), della biomassa totale vivente (concentrazione di ATP, luminescenza), la conta delle spore (colorazione e microscopia ottica), la produzione procariotica di carbonio (assorbimento di ^3H -leucina), la respirazione (consumo di O_2 in camere di incubazione e ETS), attività enzimatiche extracellulari (aminopeptidasi, fosfatasi alcalina, lipasi e beta-glucosidasi, tecnica fluorimetrica), identificazione dei siti positivi per la fosfatasi alcalina (ELF®97-P, microscopia a epifluorescenza). Nell'ambito di questo

progetto sono state anche eseguite misure dei parametri fisico-chimici dei sedimenti e della concentrazione di microinquinanti (idrocarburi policiclici aromatici – PAH- e alchilfenoli-NP) inclusi nella lista delle sostanze prioritarie della Comunità Europea approvata dalla Comunità Europea (2008/105/EC).

La composizione chimica dei sedimenti ha mostrato un elevato stato trofico caratterizzato da elevati contenuti di nutrienti (TOC e TN), sostanza organica (AFDW), e contaminanti. Diverse condizioni idrologiche, che hanno determinato nel sedimento diversi gradi di umidità dalla saturazione alla siccità, hanno modificato la concentrazione dei microinquinanti. Si è osservata una drastica riduzione della concentrazione di PAH e NP nei sedimenti secchi ($8,3 \pm 0,4$ e 299 ± 125 ng g⁻¹ rispettivamente) ed le più elevate concentrazioni in condizioni di portata media (304 ± 56 e 2710 ± 67 ng g⁻¹). Le drastiche variazioni idrologiche hanno anche determinato significativi cambiamenti dell'attività microbica del sedimento con potenziali ripercussioni sul flusso dei nutrienti. Elevate condizioni di portata, osservate nell'estate 2009, hanno determinato le più elevate produzioni procariotiche di C (*range* 0,24-0,81 $\mu\text{mol C h}^{-1} \text{ g}^{-1}$), mentre i valori più ridotti sono stati osservati durante il periodo di siccità osservato nell'estate 2010 ($0,09 \pm 0,02$ $\mu\text{mol C h}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Le portate elevate hanno inoltre stimolato l'attività enzimatica extracellulare su substrati organici fosforilati (fosfatasi alcalina $2,69 \pm 0,09$ $\mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{ g}^{-1}$), e carboniosi (beta-glucosidasi e lipasi, $1,10 \pm 0,17$ e $1,15 \pm 0,23$ $\mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ rispettivamente). La comparazione delle attività enzimatiche misurate in aree di sedimento adiacenti a diverso grado di idratazione ha mostrato una riduzione moderata di tutte le attività nel sedimento secco rispetto a quello sommerso, dove comunque l'attività di fosfatasi alcalina svolge un ruolo predominante.

Indagini di laboratorio sono state condotte per indagare sulla risposta delle comunità microbiche ai diversi fattori ambientali.

Il primo esperimento è stato allestito per descrivere la risposta dei parametri metabolici della comunità microbica alla reidratazione dei sedimenti campionati in un periodo di siccità. Nelle 24 ore successive alla reidratazione è stata osservato un incremento della biomassa e delle attività metaboliche descritte dalla misura della produzione procariotica di C, della respirazione e delle attività enzimatiche extracellulari. L'incremento della produzione procariotica di C è stata correlata all'attività di aminopeptidasi ($r=0,78$, $p<0,05$) mentre l'incremento della respirazione è correlabile a quella della concentrazione di ATP ($r=0,74$, $p<0,001$). L'abbondanza delle spore è inoltre diminuita significativamente nelle prime due ore quando il livello delle attività metaboliche ha raggiunto i valori più

elevati. L'applicazione della tecnica per l'osservazione al microscopio dei siti attivi per l'attività della fosfatasi alcalina (ELF®97P) ha mostrato, nei sedimenti secchi, un numero di siti attivi superiore al numero di cellule. Questo risultato lascia supporre la presenza di enzimi "liberi", quindi non associati alla parete delle cellule batteriche, in grado di liberare P inorganico anche in condizioni di siccità.

Le interazioni tra le comunità microbiche e gli inquinanti organici sono state indagate in microcosmi contenenti acqua di fiume ricostituita (sterile e priva di carbonio organico disciolto) e sedimenti naturali campionati nel fiume Candelaro. Il sedimento naturale (controllo) è stato arricchito con una miscela di PAH in concentrazione 10 (10X) e 100 (100X) volte più elevate di quelle misurate *in situ*. Durante i 28 giorni dell'esperimento è stata osservata all'interno della miscela di PAH una diminuzione del solo fenantrene, la cui concentrazione è risultata essere inferiore al 50% di quella misurata inizialmente. Una completa degradazione del fenantrene è stata osservata dopo una prolungata incubazione (300 giorni) nel trattamento 10X, durante la quale anche la concentrazione di fluorantene è diminuita significativamente. La presenza della miscela di PAH induce variazioni del metabolismo microbico particolarmente a carico della fosforilazione ossidativa. Un andamento negativo è stato osservato infatti in entrambi i trattamenti tra i valori della respirazione e la concentrazione di ATP (controllo, $p > 0,05$; 10X, $p < 0,05$; 100X, $p < 0,01$). Tuttavia la miscela di PAH ha stimolato significativamente la produzione procariotica di carbonio, indicando il progressivo utilizzo di questi composti. In modo anomalo però, questo incremento non è stato associato ad un incremento delle abbondanze batteriche.

In conclusione, i risultati ottenuti da questa indagine hanno contribuito a migliorare le conoscenze dei fiumi temporanei nelle varie fasi idrologiche, mettendo in luce il ruolo funzionale delle comunità microbiche nel flusso del C e degli inquinanti. I risultati di queste indagini possono rappresentare il punto di partenza per includere il compartimento microbico nelle campagne di monitoraggio il cui ruolo nei cicli biogeochimici non sembra trascurabile neanche nei periodi di siccità. Le informazioni ottenute sono fruibili dalle Autorità locali deputate alla gestione della qualità delle risorse idriche.

SUMMARY

In the semi-arid regions of the planet temporary rivers show a recurrent dry phases of varying duration and spatial extent that determine an elevated degree of instability in these ecosystems. These systems are going to be subjected to an extension of the length and frequency of extreme events as a consequence of the climate change. Despite their importance as water resource, these ecosystems have been ignored because believed “biologically inactive” during the period of drought. Scarce are to date the information on these ecosystems.

This PhD grant was funded by the European Project MIRAGE (*Mediterranean Intermittent River ManAGement*, FP7-ENV-2007-1,GA 211732, 2009-2011) and was carried out in the Laboratory of Microbial Ecology, at the Water Research Institute - National Research Council (IRSA-CNR, Rome, Italy). The aim of this Project was to provide specific key knowledge for a better assessment of ecological integrity in Mediterranean temporary rivers. In particular this survey has regarded the study of the effects of extreme hydrological conditions (drought/flooding) on the structure and function of benthic bacterial communities both *in situ* and under laboratory conditions, as well as the interactions between microbial communities and hazardous substances.

The benthic microbial communities play a crucial role in the carbon and nutrient fluxes, favouring the energy transfer to the higher levels of the detritus-based food web. In temporary rivers, the contrasting hydrological conditions can affect the correct functioning of the microbial degradation processes and thus the fate of pollutants in the environment, with severe influences on the overall ecosystem functioning.

Structural and functional characteristics of microbial benthic communities of the Candelaro river (Southern Italy) were assessed in field studies and in microcosms by measuring bacterial abundance (DAPI staining, epifluorescence microscopy), total living biomass (ATP concentration, luminescence), spore enumeration (optical microscopy after specific staining), bacterial carbon production (^3H -leucine uptake), community respiration (O_2 consumption in incubation chambers and ETS), extracellular enzymatic activities (aminopeptidase, alkaline phosphatase, lipase and beta-glucosidase, fluorimetric technique), identification of sites with extracellular alkaline phosphatase activity (ELF[®]97-P, epifluorescence microscopy). In the frame of this Project have been carried out measurements of physicochemical parameters as well as the concentration of micropollutants included in the list of priority substances approved by the European Community (2008/105/EC) as polycyclic aromatic hydrocarbons – PAHs- and

alkylphenols- NPs).

Chemical composition of sediment showed a high trophic gradient characterized by high content of nutrients (TOC e TN), organic matter (AFDW) and contaminants. Different hydrological conditions, that induced changes in sediment moisture from saturation to drought, determined changes in the concentration of micropollutants in the sediments. A drastic reduction of PAHs and NPs concentrations was observed in dry sediments (8.3 ± 0.4 and $299 \pm 125 \text{ ng g}^{-1}$ respectively) while the highest under medium flow conditions (304 ± 56 and $2710 \pm 67 \text{ ng g}^{-1}$). Drastic modifications in hydrological conditions determined significant changes of the benthic microbial activity implying repercussions on the nutrient flux. High flow conditions, in this survey observed in summer 2009, determined the highest prokaryotic C production (range $0.24\text{--}0.81 \text{ } \mu\text{mol C h}^{-1} \text{ g}^{-1}$), while the lowest rates were observed during an episode of summer (2010) drought ($0.09 \pm 0.02 \text{ } \mu\text{mol C h}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Extracellular enzyme activities were also affected by high –low flow conditions. High flow stimulated in the sediment the highest rates on organic phosphorous (alkaline phosphatase activity, max rates $2.69 \pm 0.09 \text{ } \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) as well as on carbonaceous substrates (beta-glucosidase and lipase, max rates 1.10 ± 0.17 and $1.15 \pm 0.23 \text{ } \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{ g}^{-1}$). The comparison of extracellular enzyme activities measured in adjacent areas characterized by a different degree of moisture showed a moderate reduction of all enzyme activities in the dry sediments with respect to that submerged, where overall the alkaline phosphatase activity played a main role.

Laboratory tests were carried out to investigate the microbial community responses to different environmental factors.

The first experiment was performed to test the response of metabolic properties of the microbial community to the rewetting of sediments sampled in a period of drought. In the first 24 hours after rewetting was observed a prompt response of the biomass and metabolic activities described by Prokaryotic C Production, respiration and extracellular enzyme activities. The increase of the prokaryotic C production was related to aminopeptidase activity ($r=0.78$, $p<0.05$) whereas the increase of the community respiration was related to ATP concentration ($r=0.74$, $p<0.001$). The abundance of spores decreased significantly within two hours when the highest level of microbial metabolic activity was approached. The application of the staining technique (ELF[®]97P) for the microscopic identification of the positive site for alkaline phosphatase activity, showed a number of sites higher than cell abundance even in dry sediments. This result let us infer the presence of “free” enzymes, hence not associated to the bacterial cell wall, capable to

release inorganic P even in dry conditions.

The interactions between benthic microbial communities and organic pollutants were investigated in microcosms containing reconstituted and sterilized dissolved organic C-free freshwater and natural sediment of Candelaro river. The natural sediment (control) was spiked with a mixture of PAHs in concentration 10 (10X) and 100 (100X) times higher than *in situ* values. Over the 28 days of the experiment a decrease in PAHs concentration in sediment was only observed for the phenanthrene, whose concentration was below the 50% of the initial conditions. A complete degradation of phenanthrene was then observed after a prolonged incubation (300 days) in the 10X treatment in which also fluoranthene decreased significantly. The presence of the PAH mixture induced variations of the microbial metabolism particularly in the process of oxidative phosphorylation. A significant negative trend was observed in both treatments between respiration rates and ATP concentrations (control, $p > 0.05$; 10X, $p < 0.05$; 100X, $p < 0.01$). Nevertheless, the PAH mixture stimulated significantly the increase of bacterial carbon production meaning a progressive utilization of PAH to produce biomass. Abnormally this process was not associated with the increase of the number of cells.

In conclusion, the results obtained during this experimental activity contributed to a better knowledge of temporary rivers and a better understanding of the functional role of bacterial community in the C and micropollutants flux. The results of these investigations can be the starting point to include the microbial compartment in the survey campaigns of temporary rivers, which role in biogeochemical cycles seems not negligible even in drought periods. This information is accessible by the local Authorities who manage the quality of water resources.

1. INTRODUZIONE

1.1 Ecosistema fluviale

I sistemi fluviali, le cui acque sono caratterizzate da un flusso continuo ed unidirezionale, rappresentano sistemi idrodinamici aperti di grande importanza e possono essere analizzati su diverse scale spazio-temporali come descritto nella figura 1. A livello di bacino idrografico, ovvero l'area nella quale le acque meteoriche si dirigono verso un unico solco d'impluvio, un fiume può essere visto come un *continuum* longitudinale all'interno del quale possono essere distinti tre differenti tratti (Schumm, 1977): i) sistemi di acque sorgenti, ii) tratti intermedi caratterizzati da un'elevata velocità di flusso e di trasferimento longitudinale, iii) tratti a valle caratterizzati da una ridotta velocità di flusso.

Il tratto superiore di un fiume è generalmente dominato da zone di erosione, dove l'alta velocità della corrente permette il trasporto di particelle di piccole e medie dimensioni e la deposizione di materiale litologico più grossolano. Queste zone, in cui l'elevata velocità di flusso mantiene il fondo chiaro e privo di fango o di altro materiale sospeso, sono caratterizzate da un substrato compatto, colonizzato da organismi che aderiscono al fondo (ad esempio larve di Simulidi e di Tricotteri). A valle, il corso del fiume è dominato da zone di deposizione, in cui le acque sono più profonde e le basse velocità di corrente permettono la deposizione di materiale limoso, con la formazione di piane alluvionali spesso estremamente fertili. Ogni tratto può comprendere uno o più settori di lunghezza variabile da meno di un chilometro a oltre 50 km. A questo livello sono importanti le variabili come l'altitudine, la distanza dalla sorgente e la pendenza del terreno.

Ogni settore è definito in base a quattro caratteristiche: 1) gli *input* che sono influenzati dalle condizioni climatiche, geologiche, e dall'uso del territorio nel bacino idrografico a monte; 2) le caratteristiche strutturali (pendenza, confinamento laterale, strutture artificiali); 3) i processi dinamici come le caratteristiche del flusso e l'apporto dei nutrienti; 4) le strutture artificiali a valle del settore considerato (dighe, ponti).

In ogni settore possono essere distinti diversi siti in base alle condizioni locali (permeabilità del sedimento, topografia, etc.); ogni sito comprende diversi *patch* caratterizzati dalla dominanza di materia organica bentonica di differente origine (materia organica fine, foglie, *biofilm*). I *patch* tendono ad avere piccole dimensioni che dipendono dalle caratteristiche idromorfologiche e del bacino idrografico.

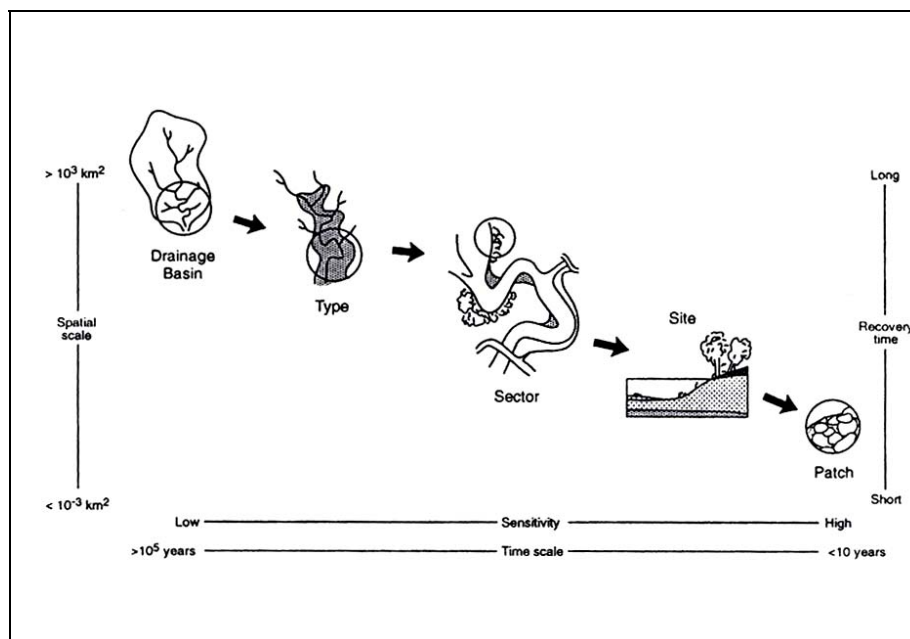


Figura 1 - Classificazione delle scale spaziali e temporali per l'analisi degli ecosistemi fluviali (Adattato da Frissel *et al.*, 1986).

La complessità e la variabilità dei fattori chimico-fisici e biologici nei diversi tratti di un fiume, determina quindi la formazione di un mosaico di biozone lungo i gradienti trasversale e longitudinale, con caratteristiche associazioni vegetali e animali. I fattori fisici più importanti per questo tipo di zonazione sono la velocità di corrente, la portata ed il regime.

La portata media annuale, regolare nei fiumi di grandi dimensioni, rappresenta il volume d'acqua che attraversa la sezione trasversale in un punto nell'unità di tempo; essa dipende dal regime delle piogge e quindi dal clima della regione, dalla posizione geografica, dalla natura del terreno. Il regime è definito *di piena* se la portata è superiore alla media annuale e *di magra* se la portata è inferiore.

I tratti dei corsi d'acqua prossimi alle sorgenti sono definiti di primo ordine. Due canali di primo ordine confluiscono a formare un unico corso d'acqua detto di secondo ordine, quindi, dall'unione di due corsi d'acqua di secondo ordine si originano canali di terzo ordine fino a definire una complessa rete idrografica che va via via aumentando di dimensioni verso valle (Strahler, 1963) (Fig. 1.1a).

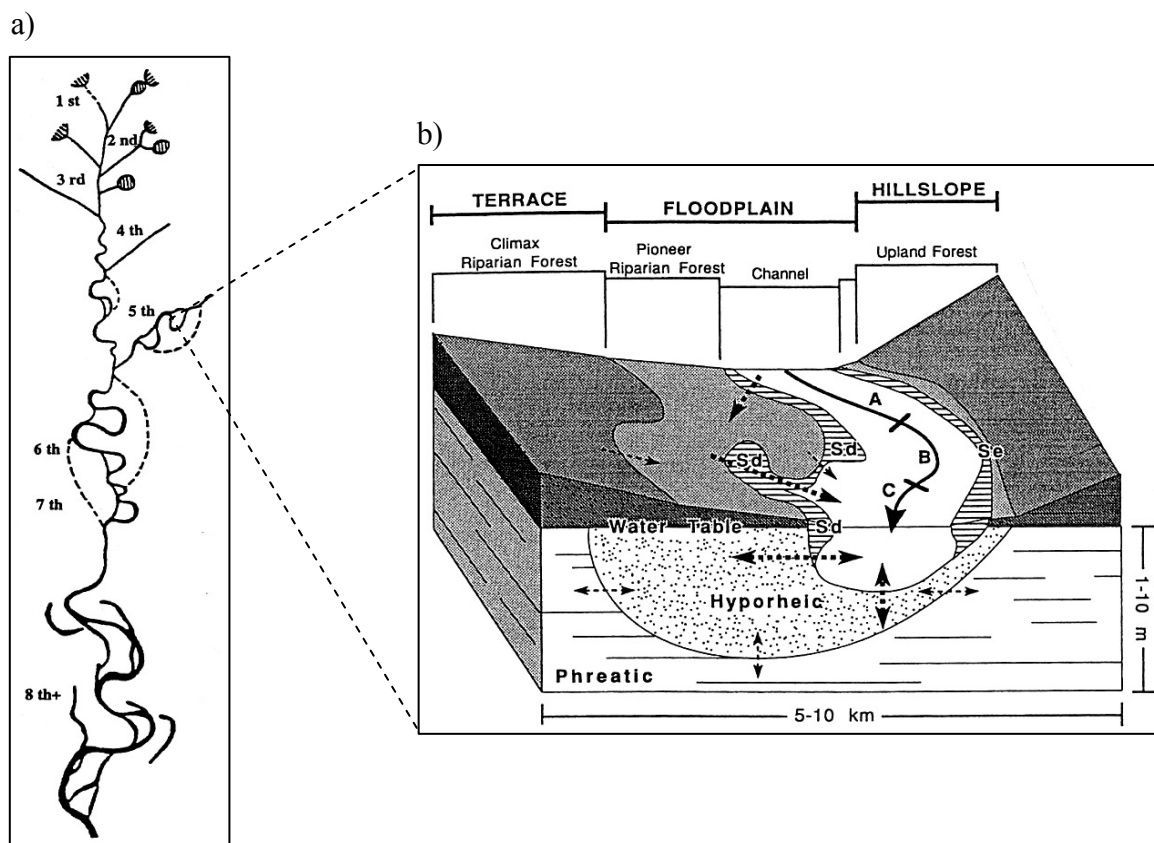


Figura 1.1 - a) Visione d'insieme di una generica rete idrografica. Sono rappresentati gli ordini dei corsi d'acqua secondo la visione di Strahler (1963); **b)** Caratteristiche principali di un fiume d'alta quota di quinto ordine (modificato da Stanford e Ward, 1992).

Il chimismo delle acque fluviali dipende in larga scala dalla natura del terreno e dalla posizione geografica. I corsi d'acqua, infatti, trasportano materiale organico ed inorganico che deriva dalle acque sotterranee e dal drenaggio del bacino idrografico. Il regime delle precipitazioni regola il flusso d'acqua ed è il principale veicolo di trasporto del materiale organico dalle acque superficiali a quelle di falda (Bernal *et al.*, 2003, Vazquez *et al.*, 2007).

1.2 Il ciclo dei nutrienti

Per via di un'eccessiva semplificazione, il ruolo attribuito ai fiumi nel ciclo globale del carbonio era quello di canali che passivamente trasportano carbonio organico e inorganico dalle terre ai mari (Fig. 1.3a). Nella visione più aggiornata i fiumi svolgono un ruolo non solo nel trasporto della sostanza organica ma anche nella sua trasformazione (Fig. 1.3b). Il carbonio veicolato nei fiumi, infatti, in parte sedimenta, in parte è trasformato in biomassa, ed in parte viene mineralizzato e rilasciato nell'atmosfera come CO_2 (Cole *et al.*, 2007). Gli ecosistemi fluviali quindi collegano gli ecosistemi terrestri con quelli marini

interagendo con l'atmosfera assumendo quindi un ruolo importante nei flussi biogeochimici del carbonio e dei nutrienti (Raymond, 2005).

Il carbonio di origine terrigeno (alloctono) raggiunge le acque fluviali principalmente per dilavamento durante le piogge. Fonti di carbonio interne al sistema (autoctono) sono quelle derivanti dai processi di fissazione della CO_2 atmosferica da parte degli organismi autotrofi. La sostanza organica è successivamente trasformata attraverso l'attività microbica e trasformata in CO_2 attraverso i processi di mineralizzazione o incorporata nella biomassa. Parte raggiunge i sedimenti e viene immessa nella catena del detrito.

I fiumi sono ecosistemi altamente dinamici e complessi soggetti a cicli di espansione e contrazione e a frammentazione lungo le proprie dimensioni longitudinali, laterali e verticali (Ward *et al.*, 2002). La propria eterogeneità spaziale e temporale si riflette sulla funzionalità dell'intero ecosistema dipendendo dai suoi componenti e dalle relazioni di questi (Meyer, 2005). A causa dell'elevata variabilità idrologica e dell'eterogeneità di questi ambienti (proprietà geomorfologiche, del suolo, intensità e frequenza delle precipitazioni, copertura vegetazionale, uso del suolo e impatto antropico) i flussi di carbonio in questi ecosistemi sono estremamente variabili.

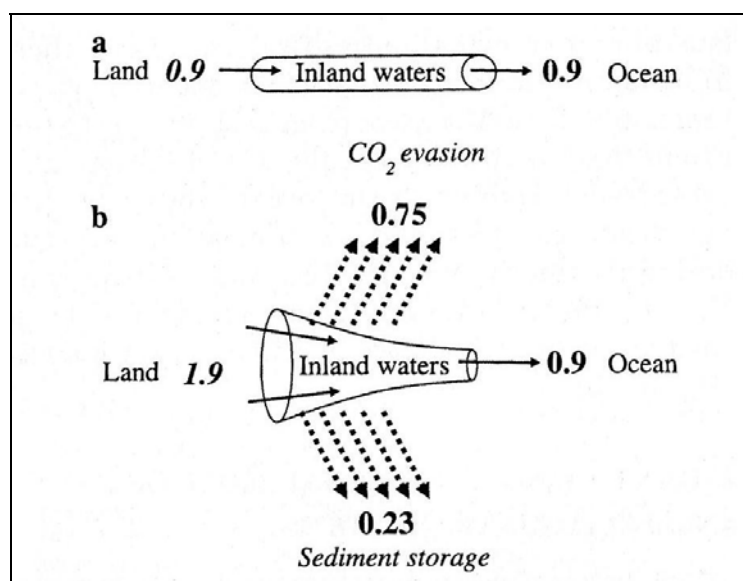


Figura 1.2 - Diverse interpretazioni sul ruolo degli ecosistemi fluviali nel ciclo del carbonio. **a)** i fiumi sono trasportatori passivi di materia organica e inorganica dalle terre verso i mari. **b)** i fiumi sono dei componenti attivi nel ciclo globale del carbonio poiché la materia organica e inorganica, oltre ad essere trasportata a valle, può essere immagazzinata nei sedimenti e rilasciata sotto forma di CO_2 nell'atmosfera (modificato da Cole *et al.*, 2007).

Globalmente per i fiumi viene stimato un assorbimento annuo di CO_2 pari a circa 0,4 Pg C (Richey, 2004). Sebbene questo corrisponda a una bassa percentuale del carbonio

immagazzinato negli oceani (~40000 Pg C), nell'atmosfera (~750 Pg C) e nel suolo (~2000 Pg C) (Grace, 2004), è significativo se confrontato con l'assorbimento netto di CO₂ degli oceani: 2 Pg C annuo (Caldeira e Akai, 2005).

Negli ecosistemi fluviali avviene la degradazione parziale o totale della sostanza organica proveniente dalla terraferma che, così trasformata, è trasportata nei corpi idrici recettori (laghi ed ecosistemi costieri) (Fig. 1.3). La mineralizzazione della sostanza organica proveniente dalla terraferma da parte degli ecosistemi fluviali è un importante regolatore del destino del carbonio (Cole e Caraco, 2001). Eventuali perturbazioni ambientali in grado di condizionare i tassi di decomposizione influenzano anche la qualità della sostanza organica esportata negli altri sistemi acquatici e gli scambi di anidride carbonica con l'atmosfera (Algesten *et al.*, 2004).

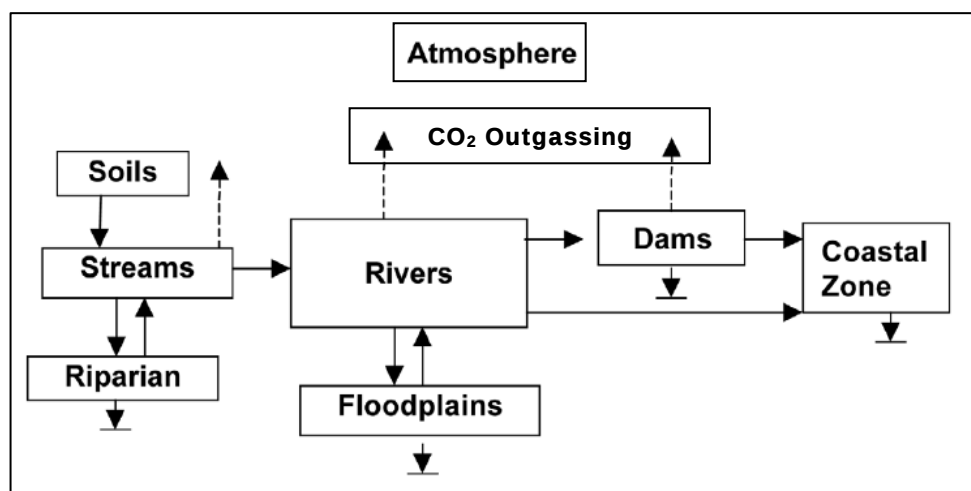


Figura 1.3 - Rappresentazione dei principali flussi di CO₂ nei sistemi fluviali. (modificato da Richey, 2004).

La corrente del fiume fornisce agli organismi sempre nuovi nutrienti che sostituiscono quelli già metabolizzati (Hynes, 1970) secondo il modello del *nutrient spiraling* (Webster e Patten, 1979; Newbold *et al.*, 1981, 1992). Tale modello descrive le successive interconversioni dei nutrienti, tra forme organiche ed inorganiche, mentre sono trasportati a valle. L'azoto ed il fosforo sono assorbiti e riciclati più volte, prima di raggiungere il basso corso; questi nutrienti possono essere assorbiti dalle alghe e dai microrganismi che sono adesi alle rocce nel fiume. Quando gli organismi muoiono, per azione del processo di mineralizzazione, i nutrienti vengono rilasciati in forma inorganica e successivamente sono riassorbiti dalle alghe e dai microrganismi più a valle.

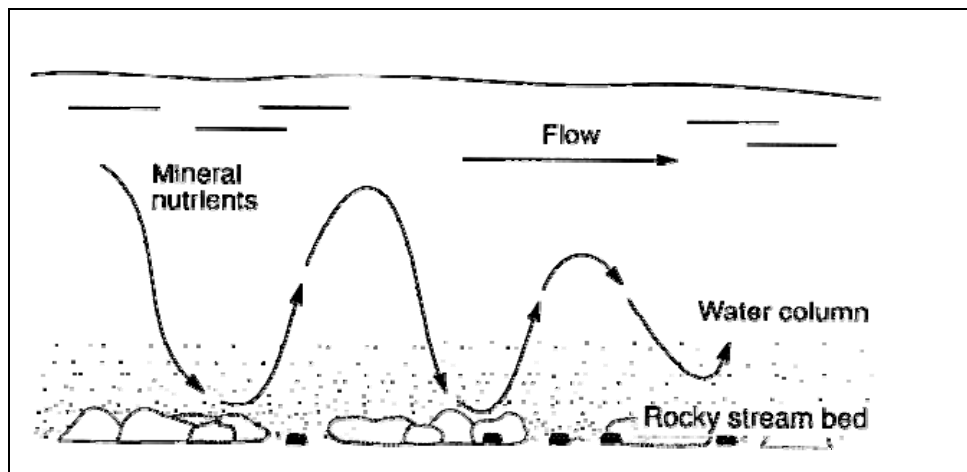


Figura 1.4 - Spiralizzazione dei nutrienti nel tratto superiore di un fiume (da Atlas e Bartha, 1998).

Questo ciclo di assorbimento-rilascio dei nutrienti, in combinazione con il flusso longitudinale delle acque, fa sì che ogni singolo atomo segua un moto che può essere schematizzato in una spirale (Fig. 1.4).

La lunghezza della spirale rappresenta la distanza percorsa da un atomo nel completare un ciclo di utilizzo, dalla forma disciolta passando attraverso una serie di trasformazioni metaboliche per poi ritornare ad una forma disciolta. Questa quindi riflette il grado di attività metabolica del sistema. Infatti, un più rapido utilizzo dei nutrienti corrisponde ad una spirale più corta, al contrario una spirale più lunga corrisponde ad un ridotto assorbimento da parte dei microrganismi ed a un carico eccessivo di nutrienti nel basso corso dei fiumi. Oltre ai nutrienti come l'azoto e il fosforo anche il carbonio organico disciolto (DOC) è soggetto ad un processo simile. In quest'ultimo caso, la lunghezza della spirale è riferita alla distanza percorsa fino alla completa ossidazione da carbonio organico a CO_2 .

Il carbonio rappresenta il maggiore costituente delle molecole che sono alla base della vita sulla terra. Oltre che nella biosfera il carbonio si trova in varie forme e combinazioni in tutti i comparti ambientali: dalla litosfera, all'idrosfera, all'atmosfera.

La più grande riserva di carbonio sulla Terra è costituita dai sedimenti e dalle rocce. Questo elemento, che rappresenta lo 0,032% della crosta terrestre, ha la sua maggiore riserva nelle rocce sedimentarie sotto forma di carbonati ($65\text{-}100 \cdot 10^{15}$ t), o in forma organica come cherogene, depositi di petrolio, carbone e metano ($5 \cdot 10^{12}$ t). Nonostante l'elevata quantità, i flussi di carbonio da questi comparti avvengono molto lentamente attraverso la solubilizzazione dei carbonati e ancora più lentamente attraverso la biodegradazione. Negli altri comparti ambientali (atmosfera, idrosfera e biosfera), la quantità di carbonio accumulata è molto inferiore ma il riciclo avviene in tempi molto brevi.

Il ciclo globale del carbonio, quindi, è costituito da un ciclo geologico “lento” che avviene tramite la mobilizzazione dell’elemento che è immagazzinato nei combustibili fossili, nei sedimenti e nelle rocce, e un ciclo biologico “veloce” che avviene tramite l’assorbimento e la trasformazione da parte degli organismi viventi. Quest’ultimo si esplica attraverso varie tappe la prima delle quali consiste nella immobilizzazione dell’anidride carbonica atmosferica da parte degli organismi autotrofi (fotosintetici e chemiosintetici) che lo trasformano in biomassa (produzione primaria). La parte di carbonio che non viene remineralizzata costituisce la produzione primaria netta. In seguito le forme organiche del carbonio sono consumate dagli organismi eterotrofi con la produzione di nuova biomassa e CO₂ attraverso la respirazione e la fermentazione. Una parte del carbonio assorbito dagli organismi autotrofi ed eterotrofi rimane associato alla biomassa e utilizzato per costituire vari componenti cellulari mentre una parte viene mineralizzata ed rilasciata nell’atmosfera sotto forma di CO₂.

Il materiale organico presente nei corsi d’acqua viene distinto, in base a criteri dimensionali, in disciolto (*Dissolved Organic Matter*, DOM) e particolato (*Particulate Organic Matter*, POM). Il POM, che generalmente viene definito come “detrito”, può essere ulteriormente suddiviso in ultrafine (*Ultra Fine Particulate Organic Matter*, UFPOM), fine (*Fine Particulate Organic Matter*, FPOM) e grossolano (*Coarse Particulate Organic Matter*, CPOM) (Fig. 1.5).

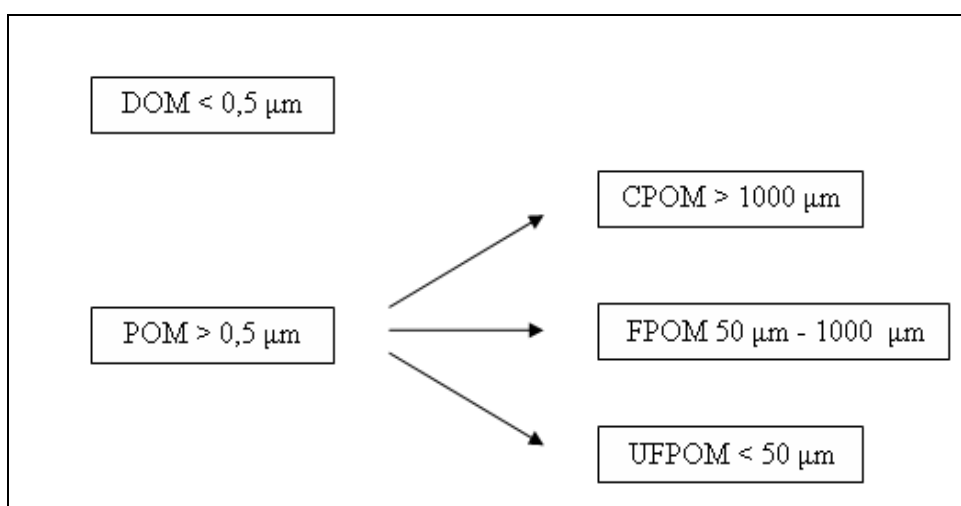


Figura 1.5 - Suddivisione dimensionale della sostanza organica.

Il CPOM è costituito principalmente da materiale di origine terrestre che deriva dalla vegetazione ripariale (Cummins e Klug, 1979) e costituisce il 90% dell’input organico nei sistemi fluviali (Scorgie, 1974). Il materiale di origine vegetale è costituito principalmente

da cellulosa e lignina con contributi che superano il 50% (Kaarik, 1974). Tra gli eterotrofi pochissime specie sono in grado di utilizzare direttamente la cellulosa e la lignina (Monk, 1976). Tra queste i funghi e i batteri dispongono di enzimi extracellulari in grado di idrolizzare tali composti.

Un'efficiente utilizzazione del detrito vegetale implica, quindi, una complessa serie di interazioni tra il detrito e i microrganismi. L'importanza del CPOM nei sistemi fluviali è anche legata ai tempi di permanenza delle particelle grossolane all'interno del sistema affinché queste possano essere colonizzate dai microrganismi ed entrare nella catena del detrito. Young *et al.* (1978) riportano che la probabilità che una particella trasportata all'interno di un corso d'acqua sia trattenuta è funzione della "efficienza di trattenimento" determinata dalle caratteristiche del fondo e delle zone ripariali. Le particelle possono essere trattenute anche passivamente e raggiungere i sedimenti quando la velocità di corrente è minore di quella richiesta a mantenere le particelle in movimento nella colonna d'acqua (Jones e Smock, 1991).

Il FPOM deriva direttamente da input terrestri o indirettamente dal frazionamento del CPOM per azione di organismi detritivori e dalla flocculazione di sostanze disciolte (Wotton, 1990). Il FPOM è una risorsa importante per molti invertebrati ed alcuni vertebrati filtratori (Benke *et al.*, 1984). Il FPOM si deposita principalmente in zone di ristagno e nelle piane di esondazione (Grubaugh e Anderson, 1989).

Il DOM, infine, è composto sia da sostanze umiche, la maggior parte delle quali non è biodisponibile ma trasportata direttamente a valle, sia da composti più instabili e di minori dimensioni utilizzati rapidamente dai microrganismi eterotrofi. Il DOM di derivazione fitoplanctonica è ricco di proteine e polisaccaridi labili, mentre quello terrestre alloctono, derivante dalla degradazione del POM e FPOM, è meno labile essendo costituito da composti relativamente resistenti alla mineralizzazione da parte dei batteri (Benner, 2002). Il DOM di origine fluviale è meno labile rispetto a quello dei sistemi marini dove è principalmente prodotto dagli organismi planctonici (essudazione, escrezione, fecal pellets e frammenti di organismi morti). Il biofilm, ossia la pellicola biologica risultante dall'adesione di microrganismi, autotrofi ed eterotrofi, su una superficie sommersa, è un importante sito di assorbimento del DOM.

I nutrienti come l'azoto ed il fosforo svolgono un ruolo di notevole importanza per il metabolismo microbico. Fonti di nitrati e fosfati sono le piogge (deposizione atmosferica) e le acque di drenaggio del bacino idrografico. Quando i terreni sono adibiti ad uso agricolo la

quantità di nitrati e di fosfati introdotta può raggiungere valori molto elevati sebbene l'azoto ed il fosforo vengono utilizzati rapidamente dagli organismi e quindi rapidamente riciclati.

La più grande riserva di azoto si trova sia sotto forma gassosa molecolare (N_2) nell'atmosfera che disciolta nelle acque; termodinamicamente l'azoto gassoso rappresenta la forma più stabile e per spezzare il triplo legame è richiesta una grande quantità di energia. Negli ambienti acquatici l'azoto organico è presente in forma disciolta (di dimensioni $< 0,45 \mu m$) e particolata.

Molti batteri, aerobi ed anaerobi, incluso alcuni cianobatteri (Young, 1992) hanno la capacità di assimilare N_2 (fissazione). Nel processo di azoto-fissazione, avviene la riduzione di N_2 gassoso ad ammoniaca ($N_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2$) che verrà poi incorporata nei composti organici. Il processo di riduzione è catalizzato dal complesso enzimatico della nitrogenasi. Questa reazione è favorita da basse concentrazioni di ossigeno poiché tale elemento inibisce l'attività della nitrogenasi (Etherington, 1983).

A pH neutro o acido lo ione ammonio (NH_4^+) rappresenta la forma ionica più abbondante. In condizioni basiche, invece, è convertito in ammoniaca gassosa (NH_3). Nelle acque i nitriti (NO_2^-) sono generalmente presenti in basse concentrazioni mentre in presenza di acque reflue possono raggiungere elevate concentrazioni con effetti tossici sul sistema. L'insieme di nitriti, nitrati (NO_3^-) e dello ione ammonio rappresenta l'azoto inorganico disciolto biologicamente disponibile. L'azoto organico è rappresentato dagli amminoacidi, gli acidi nucleici, le proteine e l'urea.

Nella maggior parte dei sedimenti anossici l'azoto si trova sottoforma di ammoniaca derivante dalla reazione di mineralizzazione di un composto con azoto organico come ad esempio l'urea ($NH_2 \cdot CO \cdot NH_2 + H_2O \rightarrow 2NH_3 + CO_2$, $NH_3 + H_2O \rightarrow NH_4^+ + OH^-$). Alcuni batteri chemioautotrofi sono in grado di ossidare lo ione ammonio, attraverso il processo di nitrificazione che avviene in due fasi, una ad opera di *Nitrosomonas* sp. ($2NH_4^+ + 3O_2 \rightarrow 2NO_2^- + 2H_2O + 4H^+ + \text{energia}$) ed una ad opera di *Nitrobacter* sp. ($2NO_2^- + O_2 \rightarrow 2NO_3^- + \text{energia}$).

Il nitrato (NO_3^-), essendo uno ione negativo, rispetto allo ione positivo dell'ammonio, non è soggetto all'immobilizzazione dovuta alle particelle del suolo cariche negativamente e di conseguenza è molto più mobile in soluzione; se non è assimilato immediatamente dalle piante o dai microrganismi, può essere ridotto attraverso la dissimilazione riduttiva. Le riduzioni più ricorrenti sono quelle ad ammoniaca e la denitrificazione. La denitrificazione, condotta da microrganismi in condizione anaerobiche, è responsabile della conversione del nitrato in N_2 gassoso. Il nitrato è utilizzato come un accettore di

elettroni, portando quindi ad una perdita di azoto a causa della conversione a ossido nitroso gassoso (N_2O) e azoto molecolare (N_2). La concentrazione di azoto nei fiumi può variare molto per le complesse dinamiche che si instaurano negli ecosistemi acquatici e in quelli terrestri.

1.3 Le comunità microbiche

Secondo una definizione classica con il termine microrganismi si comprendono tutti quegli organismi che hanno una dimensione del diametro inferiore a 200 micrometri (Karl, 1980). In accordo con tale definizione, la comunità microbica presente negli ambienti acquatici è costituita da virus, archeobatteri, batteri, alghe, funghi, protozoi e da alcuni taxa di piccoli metazoi. Questi organismi, grazie all'elevato rapporto superficie-volume, hanno un'elevata interazione con l'ambiente che li circonda. Tra questi la componente batterica assume un ruolo molto importante perché si pone alla base della catena trofica del detrito, mediando il trasferimento di energia dalla sostanza organica disciolta ai livelli superiori della catena trofica attraverso la produzione di biomassa. Non trascurabile è però l'azione dei funghi specializzati nella degradazione del detrito di grandi dimensioni (frammenti vegetali, insetti, animali) e nella decomposizione di polimeri complessi come la lignina, la cellulosa e la chitina. Per questa loro specializzazione, i funghi si sono dimostrati abili anche nella degradazione di contaminanti ambientali (Ravelet *et al.*, 2000).

All'interno dell'ambiente acquatico i microrganismi colonizzano diversi comparti: l'interfaccia aria-acqua (neuston), la colonna d'acqua (plancton), la superficie delle macrofite o di ogni altra struttura immersa (perifiton) ed i sedimenti (benthos). Le comunità microbiche che colonizzano questi ambienti possono differire profondamente dal punto di vista strutturale e funzionale (Raina *et al.*, 2009).

Nei fiumi caratterizzati da una scarsa profondità e da un flusso continuo di acqua, le popolazioni microbiche del neuston e del plancton sono poco rappresentate. La gran parte dei microrganismi è contenuta nel perifiton e nei sedimenti.

L'abbondanza batterica associata ai sedimenti è di notevole entità (fino a 10^9 cellule per g di sedimento secco) in virtù della maggiore disponibilità di risorse rispetto alla colonna d'acqua. Il numero di batteri raggiunge il picco massimo all'interfaccia acqua-sedimento e circa il 90% dei batteri è contenuto nei primi 10 cm e adeso in prevalenza alle particelle con dimensioni minori di 2 mm, mentre un decremento logaritmico è osservato con l'aumentare della profondità (Romanì *et al.*, 1998).

Le conoscenze finora acquisite sulla composizione delle comunità batteriche negli ambienti d'acqua dolce evidenziano alcuni gruppi ubiquitari che sono quelli degli α -*Proteobacteria*, dei β -*Proteobacteria*, dei *Cytophaga-Flavobacterium* (CF) e degli *Actinobacteria* (Zwart *et al.*, 2002). I Proteobatteri in genere costituiscono sempre il gruppo più numeroso della comunità, sono sempre presenti in condizioni di abbondanti concentrazioni di carbonio organico disciolto e colonizzano sia la colonna d'acqua che i sedimenti (Zwisler *et al.*, 2003). I *Cytophaga-Flavobacterium* (CF) sono spesso associati alla presenza di materiale organico disciolto con alto peso molecolare e materiale particolato come il detrito fogliare, infatti sono particolarmente abili nel degradare polimeri complessi come la lignina e la cellulosa (Selje e Simon, 2003; Fazi *et al.*, 2005; Lydell *et al.*, 2004).

1.3.1 Principali fattori che influenzano l'attività delle comunità microbiche

Le comunità microbiche subiscono le variazioni ambientali che spesso rendono critica la loro stessa sopravvivenza. Per superare queste difficoltà la maggior parte dei microrganismi adotta efficaci meccanismi di adattamento.

La temperatura influenza direttamente le attività metaboliche dei microrganismi. In particolare la velocità di crescita aumenta all'aumentare della temperatura. Questo è il motivo principale per cui nei periodi più caldi l'attività dei microrganismi risulta maggiore che nei periodi più freddi. Superata la temperatura ottimale la velocità di crescita tende a diminuire sino alla morte cellulare causata dalla denaturazione termica delle macromolecole fondamentali. Questo fenomeno può avvenire soprattutto nei suoli e nei sedimenti esposti all'aria nelle regioni semiaride dove la temperatura al suolo raggiunge picchi di 60°C.

La disponibilità di ossigeno, utilizzato come accettore finale di elettroni nella respirazione aerobica, influenza la struttura ed il metabolismo della comunità microbica anche se non tutti i microrganismi necessitano di condizioni aerobie per il loro metabolismo. Infatti, i microrganismi possono essere suddivisi in: aerobi obbligati, quando il loro metabolismo dipende dalla presenza di ossigeno; microaerofili, quando richiedono basse concentrazioni di O₂; anaerobi facoltativi, quando adattano il metabolismo alla disponibilità o meno di O₂; anaerobi aerotolleranti, quando hanno un metabolismo esclusivamente anaerobico ma dimostrano una crescita limitata o scarsa anche a bassi livelli di O₂; anaerobi stretti od obbligati, per i quali anche una breve esposizione a basse concentrazioni di ossigeno risulta tossica. Nei fiumi la riareazione provocata dal moto

turbolento della corrente garantisce costantemente un abbondante quantitativo di ossigeno disciolto. Nel comparto dei sedimenti, invece, l'ossidazione dell'abbondante sostanza organica richiede un'adequata quantità di ossigeno disciolto che produce spesso stati di anossia già a pochi centimetri di profondità del sedimento. L'ossigeno inoltre può anche avere un effetto tossico dovuto alla formazione di prodotti di reazione fortemente ossidanti (radicale superossido, perossido di idrogeno, radicale ossidrilico). I microrganismi aerobi e anaerobi facoltativi o tolleranti producono enzimi (superossido dismutasi, catalasi e perossidasi) che detossificano questi prodotti, mentre i microrganismi anaerobi stretti non mostrano questa capacità.

La disponibilità di acqua allo stato liquido è fondamentale per i microrganismi poiché garantisce la loro sopravvivenza e la biodisponibilità dei nutrienti. I meccanismi di adattamento dei microrganismi alla scarsa presenza di acqua sono ancora poco conosciuti nonostante numerosi organismi procarioti ed eucarioti siano capaci di sopravvivere in condizioni di completa disidratazione. La strategia più comunemente adottata per far fronte a questa condizione sono la formazione di spore in grado di resistere ad improvvisi stress fisici. La produzione e l'immagazzinamento di soluti come amminoacidi e carboidrati a basso peso molecolare, in grado di acclimatare i microrganismi a basse quantità di acqua (Halverson *et al.*, 2000), è molto frequente nei batteri Gram-negativi che non sono in grado di produrre spore e possiedono una parete cellulare meno robusta dei Gram-positivi (Fierer *et al.*, 2003; Schimel *et al.*, 2007).

L'inattivazione dei processi metabolici è un altro meccanismo di adattamento alle condizioni di stress idrico. In questa fase di quiescenza, i microrganismi o le spore da essi prodotte risultano metabolicamente inattive anche se studi recenti in ambienti estremi hanno messo in dubbio questa affermazione (Gilichinsky *et al.*, 1992; Coolen e Overmann, 2000).

La disponibilità della sostanza organica e dei nutrienti influenza l'attività e la struttura della comunità microbica. In particolare i fiumi rappresentano un sito ideale per studiare queste relazioni poiché sia la concentrazione che la qualità della sostanza organica variano notevolmente (Mulholland, 2001).

La composizione della sostanza organica presente nei fiumi è largamente determinata dalla componente alloctona di origine terrigena ed antropica. Non tutta la sostanza organica disponibile è però direttamente utilizzabile dalla comunità microbica per via delle dimensioni e della complessità delle strutture che la caratterizzano (Puddu *et al.*, 2003). La sola frazione biodisponibile è in grado di contribuire ad una crescita batterica ottimale dal

punto di vista energetico. Per l'utilizzo di molecole complesse i batteri necessitano di enzimi extracellulari in grado di idrolizzare diverse classi di composti, come è spiegato più avanti.

Inoltre per i batteri eterotrofi il DOM assimilato deve disporre anche di adeguate concentrazioni di azoto e fosforo nel rapporto molare descritto da Goldmann (C:N:P = 45:9:1). La mancata disponibilità di uno di questi nutrienti condiziona il metabolismo cellulare (Goldmann *et al.*, 1987).

1.3.2 Ruolo delle comunità microbiche nei flussi di carbonio

Nella visione classica la catena trofica è costituita dal fitoplancton (produttori primari) che viene consumato dallo zooplancton che a sua volta costituisce il nutrimento per gli organismi superiori. Teorie recenti hanno messo in evidenza come il trasferimento di carbonio e di energia tra i livelli trofici risulti molto più complesso perché una porzione di carbonio fissata dalla fotosintesi è rilasciata nella colonna d'acqua sotto forma di DOM ed utilizzata dai batteri (*microbial loop*) (Azam *et al.*, 1983).

Dal punto di vista trofico i microrganismi svolgono un ruolo chiave negli ecosistemi acquatici essendo responsabili della maggior parte del flusso energetico e del riciclo dei nutrienti. Attraverso l'attività di mineralizzazione della sostanza organica si rendono biodisponibili i nutrienti che, utilizzati per la sintesi di nuova biomassa, contribuiscono ad alimentare gli organismi di ordine superiore. Una perturbazione ambientale può, quindi, ripercuotersi sulla catena trofica e sulla produttività dell'ecosistema stesso.

I microrganismi, tra cui anche i batteri, sono caratterizzati da una grande versatilità metabolica, sia tra le varie specie sia all'interno della stessa specie.

La maggior parte della sostanza organica degli ambienti acquatici è sotto forma macromolecolare e non direttamente assimilabile dai microrganismi. Le molecole con un peso inferiore a 600 Dalton (es: aminoacidi, zuccheri semplici, acidi grassi) sono invece direttamente assimilabili. A far fronte a questo problema intervengono numerosi enzimi extracellulari, direttamente prodotti dalle cellule, che idrolizzano la sostanza organica particolata e la rendono così disponibile per l'assorbimento (Hoppe, 1991).

I principali processi catabolici dei microrganismi eterotrofi sono la respirazione e la fermentazione che avvengono rispettivamente in ambiente aerobico e anaerobico. L'energia ricavata da questi viene accumulata sotto forma di adenosintrifosfato (ATP) che rappresenta il principale vettore energetico utilizzabile per i processi vitali della cellula.

L'ATP è sintetizzato attraverso un processo di fosforilazione a livello di substrato, o con un processo di fosforilazione ossidativa. Il primo caso è tipico della fermentazione: in tale processo si ha un'ossidazione non completa della molecola organica e l'accettore finale di elettroni è un'altra molecola organica interna allo stesso processo. Quando invece l'ossidazione della molecola organica è completa e l'accettore finale di elettroni è l'O₂ si parla di respirazione aerobica.

In alcune specie batteriche la completa ossidazione del substrato organico avviene utilizzando accettori finali di elettroni diversi dall'O₂. Questo tipo di respirazione in assenza di ossigeno è tipica degli anaerobi facoltativi, dei batteri denitrificanti e degli archeobatteri.

L'energia prodotta dai processi catabolici è utilizzata sia per la sintesi di nuovo materiale cellulare (biosintesi) che per i processi di mantenimento che occorrono alla sopravvivenza della cellula (es: trasporto di nutrienti attraverso le membrane e motilità). Inoltre le stesse molecole sintetizzate possono servire come substrato per ricavare energia.

Quando prevalgono i processi di biosintesi sulla respirazione si ha un netto guadagno di carbonio da parte dell'ecosistema poiché la cellula batterica sintetizza biomassa ottimizzando i processi. L'energia così immagazzinata può essere trasferita ai predatori garantendo il flusso di energia verso i livelli trofici superiori. Quando invece prevalgono i processi di mineralizzazione il carbonio viene rilasciato in atmosfera sotto forma di CO₂ con una netta perdita di energia per la catena trofica.

1.3.3 Ruolo delle comunità microbiche nei sedimenti

Negli ecosistemi fluviali gli apporti di energia provenienti dalla sostanza organica (DOM e POM) possono derivare da fonti autoctone, interne al sistema, o alloctone, di origine esterna. Parte della biomassa prodotta dai produttori primari, non è consumata direttamente dai predatori lungo la "catena trofica del pascolo", ma entra, unitamente alla sostanza organica particolata di origine alloctona, nel comparto del detrito, dando origine a quella che è definita "catena del detrito" (Fig. 1.6).

Il detrito organico va incontro ad un processo di degradazione che inizia con l'attività dei microrganismi eterotrofi la cui produzione di biomassa prende il nome di "produzione secondaria". Il tempo e le modalità di degradazione della sostanza organica dipendono, come già detto, dalle dimensioni delle molecole e dalla loro struttura.

L'apporto di materiale alloctono è generalmente continuo, anche se, in condizioni naturali nelle zone temperate, gli *input* più consistenti si registrano in autunno per la caduta

delle foglie, in occasione delle prime piogge ed in primavera per la massima portata dei corsi d'acqua.

Nelle comunità bentoniche la produzione primaria è spesso insignificante per via della ridotta disponibilità di luce e i flussi biogeochimici avvengono principalmente attraverso la “catena trofica del detrito” (Fleith et al., 2001; Findlay et al., 2002; Logue et al., 2004).

Rispetto all'attività della comunità microbica, i sedimenti fluviali sono estremamente irregolari in termini spaziali e temporali. Sono stati identificati *hot spots* caratterizzati da elevati tassi di attività e *hot moments* caratterizzati da particolari periodi in cui possono avvenire significativi eventi biogeochimici (McClain et al., 2003).

La frazione microbica attiva negli habitat acquatici è molto variabile (Del Giorgio e Scarborough, 1995). Nei sedimenti l'attività batterica totale è relativamente bassa se confrontata con l'elevata abbondanza, implicando un lungo tempo di duplicazione o una ridotta frazione attiva. Come conseguenza il calcolo delle attività specifiche è spesso sottostimato se si considerano tutte le cellule ugualmente attive. Alcuni studi riportano comunque una frazione batterica attiva nei sedimenti che varia da 4% a 67% (Fischer e Pusch, 1999; Luna et al., 2002).

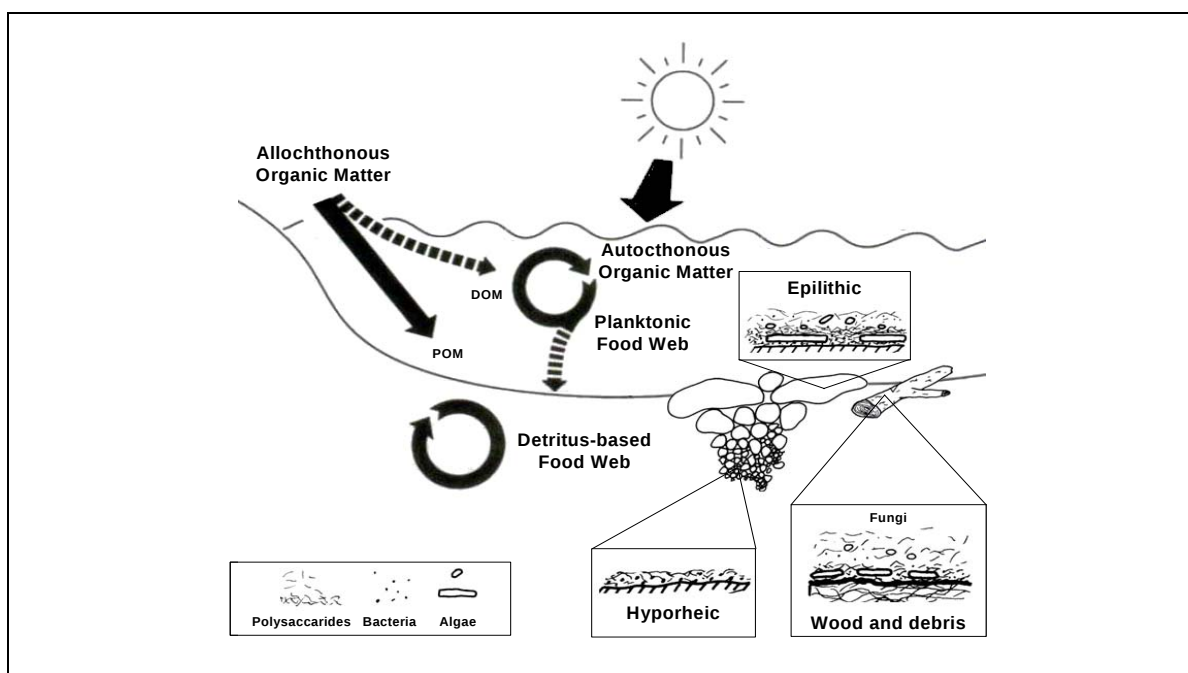


Figura 1.6 -Rappresentazione schematica del ciclo della materia organica nei fiumi (Howarth, 1996).

Ci sono alcuni processi che regolano la frazione attiva di batteri nelle comunità pelagiche e bentoniche: i) il tasso di crescita dei batteri attivi (produzione di nuove cellule); ii) il tasso di inattivazione o di morte (anche per effetto della predazione); iii) la perdita di

cellule attive e inattive per trasporto da parte della corrente (Del Giorgio e Scarborough, 1995). Questi processi sono regolati da vari fattori ambientali. Almeno su scala stagionale, la temperatura può spiegare più del 80% della variazione nella frazione di batteri pelagici attivi (Jugnia *et al.*, 2000). Altri fattori come la disponibilità di nutrienti e la predazione sono altrettanto importanti (Smith, 1998). È stato mostrato come la frazione di batteri attivi aumenti al crescere della concentrazione di nutrienti (Del Giorgio e Scarborough, 1995) e della sostanza organica specie se particolarmente labile (Puddu *et al.*, 2003). Quindi c'è una relazione positiva tra la produttività e l'abbondanza di batteri attivi, confermando l'importanza del rifornimento di substrato (Yager *et al.*, 2001).

Anche in presenza di predatori si ha un aumento delle cellule attive dovuto a forme di adattamento della comunità microbica e al rilascio di nutrienti derivanti dalla lisi cellulare (Del Giorgio *et al.*, 1996).

1.4 I fiumi temporanei

Gli studi di ecologia sugli ambienti fluviali si sono concentrati prevalentemente sui sistemi caratterizzati da un flusso permanente. In seguito ai cambiamenti climatici, le temperature medie, la durata e la frequenza dei periodi di siccità e di conseguenza la variabilità idrologica dei fiumi sono destinate ad aumentare (Gregory *et al.*, 1997; IPCC, 2007). L'elaborazione dei modelli climatici ha previsto cambiamenti nell'idrologia degli ambienti fluviali con una riduzione della portata del 20-30% entro il 2050 (Milly *et al.*, 2005). Si prevede dunque che l'exasperazione delle caratteristiche idrologiche possa colpire in particolar modo i sistemi già naturalmente caratterizzati da una elevata variabilità, quali i sistemi fluviali a carattere temporaneo.

I fiumi “temporanei” sono molto comuni nelle aree mediterranee che sono caratterizzate da una varietà di microclimi che vanno da quello umido a quello semi-arido (Hooke e Mant, 2002). Nelle regioni aride e semiaride i fiumi temporanei coprono circa un terzo della superficie terrestre, facendone uno dei più comuni ed ancora poco conosciuti ecosistemi fluviali (Jacobson *et al.*, 2000).

I corpi idrici, caratterizzati da un flusso irregolare e da cicliche fasi di siccità, sono classificati come acque temporanee. Questa terminologia include una molteplicità di ambienti fluviali ampiamente distribuiti in tutto il mondo, come fiumi temporanei, laghi stagionali, pozze d'acqua temporanee. Nelle regioni aride e semiaride i fiumi temporanei coprono circa un terzo della superficie terrestre, facendone uno dei più comuni ed ancora poco conosciuti ecosistemi fluviali (Jacobson *et al.*, 2000). Nelle aree mediterranee, i fiumi

temporanei costituiscono le più importanti risorse idriche, coprendo il 26% della superficie (Tzoraki *et al.*, 2004).

Secondo il Decreto Ministeriale del 16 giugno 2008, n. 131 in materia di caratterizzazione dei corpi idrici, i corsi d'acqua a carattere temporaneo sono stati classificati come segue:

- “corso d'acqua temporaneo”: un corso d'acqua soggetto a periodi di asciutta totale, o di tratti dell'alveo, annualmente o almeno 2 anni su 5;
- “corso d'acqua intermittente”: un corso d'acqua temporaneo con acqua in alveo per più di 8 mesi all'anno, che può manifestare asciutte anche solo in parte del proprio corso e/o più volte durante l'anno;
- “corso d'acqua effimero”: un corso d'acqua temporaneo con acqua in alveo per meno di 8 mesi all'anno ma stabilmente; a volte possono essere rinvenuti tratti del corso d'acqua con la sola presenza di pozze isolate;
- “corso d'acqua episodico”: un corso d'acqua temporaneo con acqua in alveo solo in seguito ad eventi di precipitazione particolarmente intensi, anche meno di una volta ogni 5 anni.

L'elevata variabilità idrologica di questi corpi idrici ha notevoli effetti sull'ecosistema fluviale. I periodi di siccità causano una perdita dell'habitat per gli organismi acquatici e un'alterazione delle risorse (Lake *et al.*, 2003). Nei periodi successivi, gli intensi eventi di piena associati alle prime piogge, determinano il dilavamento dei sedimenti, e la risospensione ed il trasporto di materiale particolato a valle (Bernal *et al.*, 2002) (Fig. 1.7).

L'elevata variabilità idrologica rende questi corpi idrici particolarmente sensibili alla pressione antropica soprattutto durante l'estate quando l'intensa evapotraspirazione e l'eccessivo prelievo contribuiscono a prolungare il periodo di siccità (Dahm *et al.*, 2003). Le acque dei fiumi temporanei rappresentano, infatti, delle importanti fonti di approvvigionamento idrico per le popolazioni limitrofe per uso idropotabile, idroelettrico e per l'irrigazione.

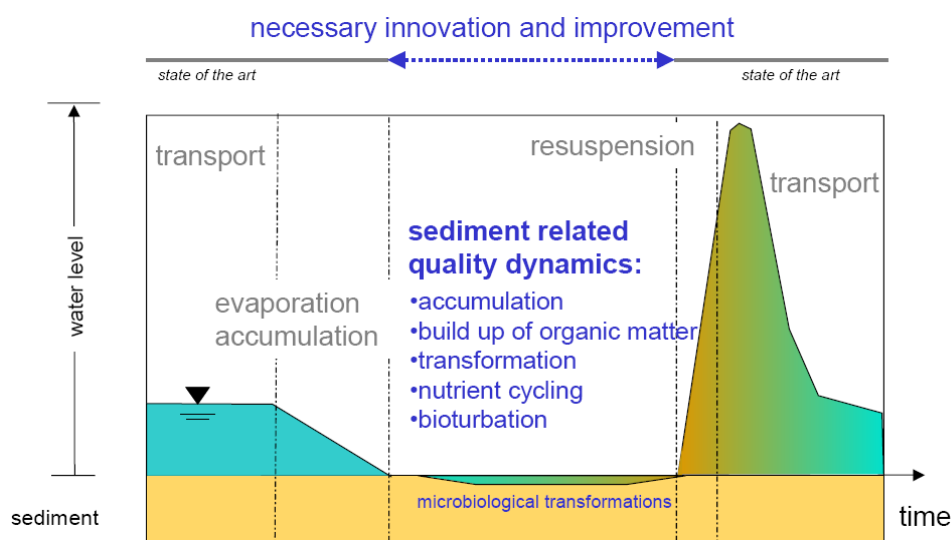


Figura 1.7 – Modello concettuale del flusso idrico di un fiume temporaneo (modificato da TempQsim-Consortium, 2006).

Le conoscenze sui processi di trasformazione della sostanza organica in questi ambienti sono molto scarse. I periodi di siccità e di inondazione causano cambiamenti della disponibilità della sostanza organica e dei nutrienti ed influiscono sull'attività di mineralizzazione e sulla struttura della comunità microbica (Ylla *et al.*, 2010).

La riduzione del flusso idrico causa una diminuzione della turbolenza e un aumento dell'accumulo della sostanza organica e dei nutrienti, che si depositano principalmente nelle “pozze” isolate che si formano nella fase di transizione tra la riduzione del flusso e la siccità. Con l'arrivo delle prime precipitazioni, il ritorno del flusso idrico mobilita il materiale organico depositato nel sedimento trasportandolo a valle (Bernal *et al.*, 2002, Ademollo *et al.*, 2011) (Fig. 1.7). Un eccessivo carico di sostanza organica labile, o di inquinanti non biodisponibili, può essere trasportato a valle e influire sulla qualità dei corpi idrici recettori (es. laghi, acque costiere, invasi).

Gli ambienti fluviali in condizioni di siccità sono stati definiti “biologicamente inattivi” (Stanley *et al.*, 1997). Recenti indagini hanno mostrato che, nei periodi in cui la siccità progredisce, l'attività microbica diminuisce rapidamente sebbene non si esaurisca completamente neanche quando il sedimento è completamente privo di umidità (Sirov *et al.*, 2006, Amalfitano *et al.*, 2008; Zoppini e Marxsen, 2011).

Durante il periodo di siccità la degradazione della sostanza organica può procedere, anche se lentamente, e dare origine a materiale organico biodisponibile mai utilizzato a causa della ridotta vitalità batterica (Amalfitano *et al.*, 2008; Zoppini e Marxen, 2011). Questo può rappresentare un vantaggio per le cellule microbiche sopravvissute che

riescono così a ristabilire rapidamente le loro funzioni metaboliche al sopravvenire dell'acqua (Fazi *et al.*, 2008).

Le variazioni chimico-fisiche del sedimento durante i periodi di siccità, oltre ad influire sulle caratteristiche della sostanza organica, causano modificazioni sulla distribuzione e degradazione degli inquinanti organici.

La riduzione del contenuto di acqua nel sedimento causa un aumento del potenziale redox, la diminuzione del pH e cambiamenti nel raggruppamento delle particelle di sedimento. Queste variazioni alterano le interazioni tra gli inquinanti organici e il sedimento, come le capacità di assorbimento degli inquinanti alle particelle organiche, ed i processi di volatilizzazione e degradazione (Ademollo *et al.*, 2011).

1.5 I microinquinanti ed il quadro normativo

L'Unione europea (UE) ha definito un quadro comunitario per la protezione e la gestione dell'acqua. La base normativa a livello comunitario in materia di classificazione dello stato di qualità di un corpo idrico è la Direttiva 2008/105/CE. Tale Direttiva istituisce gli Standard di Qualità Ambientale (SQA) per le sostanze prioritarie conformemente alle disposizioni e agli obiettivi della Direttiva 2000/60/CE che per prima ha istituito un vero quadro per l'azione comunitaria in materia di protezione delle acque. Tale normativa ha dato inizio ad una nuova politica di gestione delle risorse idriche, proponendosi come obiettivo il raggiungimento di un "buon stato" di qualità di tutte le acque superficiali e di falda entro il 2015. La successiva Direttiva Europea 2008/105/CE istituisce gli Standard di Qualità Ambientale (SQA) per le sostanze prioritarie conformemente alle disposizioni e agli obiettivi della Direttiva 2000/60/CE. Le sostanze prioritarie sono inquinanti conosciuti alla comunità scientifica in ragione della loro distribuzione nell'ambiente e dei loro effetti negativi sulla salute umana. Gli SQA prendono come riferimento i dati relativi agli effetti acuti e cronici delle sostanze inquinanti e vengono espressi come valore medio per l'esposizione a lungo termine e come concentrazione massima ammissibile per l'esposizione a breve termine. Inoltre, secondo le disposizioni della Direttiva, gli stati membri devono provvedere all'acquisizione di dati riguardanti le concentrazioni delle sostanze elencate nell'allegato I del documento. Tra queste sostanze figurano anche gli idrocarburi policiclici aromatici di cui vengono riportati gli SQA espressi in $\mu\text{g L}^{-1}$ così come riportato nella Direttiva 2008/105/CE (Tab. 1).

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
	Denominazione della sostanza	Numero CAS	SQA-AA Acque superficiali interne	SQA-AA Altre acque di superficie	SQA-CMA Acque superficiali interne	SQA-CMA Atre acque di superficie
(15)	Fluorantene	206-44-0	0,1	0,1	1	1
(28)	Idrocarburi policiclici aromatici					
	Benzo(a)pirene	50-32-8	0,05	0,05	0,1	0,1
	Benzo(b)fluorantene	205-99-2	$\Sigma = 0,03$	$\Sigma = 0,03$	Non	Non
	Benzo(k)fluorantene	207-08-9			applicabile	applicabile
	Benzo(g,h,i)perilene	191-24-2	$\Sigma = 0,002$	$\Sigma = 0,002$	Non	Non
	Indeno(1,2,3-c,d)pirene	193-39-5			applicabile	applicabile
(24)	Nonilfenolo (4-nilfenolo)	104-40-5	0,3	0,3	2,0	2,0

Tabella 1 - Standard di Qualità Ambientale (SQA) in $\mu\text{g L}^{-1}$ per gli idrocarburi policiclici aromatici e nonilfenolo (Allegato I della Direttiva 2008/105/CE).

Per gli idrocarburi appartenenti alla voce n. 28 è applicabile ogni singolo SQA, devono cioè essere rispettati l'SQA per il benzo(a)pirene, l'SQA relativo alla somma di benzo(b)fluorantene e benzo(k)fluorantene e l'SQA relativo alla somma di benzo(g,h,i)perilene e indeno(1,2,3-cd)pirene.

Le colonne 4 e 5 si riferiscono alla media aritmetica annuale (AA) delle concentrazioni rilevate con frequenza mensile per ciascun punto di monitoraggio, mentre le colonne 6 e 7 rappresentano la concentrazione massima ammissibile (CMA) per ciascun punto di monitoraggio. Alla voce n. 24, gli SQA sono invece riferiti solamente al nonilfenolo.

Poiché gli idrocarburi policiclici aromatici tendono a depositarsi e ad accumularsi nei sedimenti, sarebbe opportuno che le normative europee tenessero conto anche dei possibili effetti sugli organismi bentonici. L'unico documento di riferimento per l'inquinamento del sedimento da PAH e NP viene fornito dalle “*Canadian Council of Ministers of the Environment*” (1998). In questo documento vengono definiti i livelli di concentrazione tollerabili (ISQGs) per PAH, NP e derivati (NPE) ed i livelli di probabile effetto (PELs) dei PAH ed i fattori di equivalenza tossica (TEFs) del nonilfenolo (Tab. 1.2-1.3).

LMW-PAHs	ISQG	PEL
Naftalene	34,6*	391*
2-Metilnaftalene	20,2*	201*
Acenaftilene	5,87*	128*
Acenaftene	6,71*	88,9*
Fluorene	21,2*	144*
Fenantrene	41,9	515
Antracene	46,9*	245*
HMW-PAHs		
Fluorantene	111	2355
Pirene	53,0	875
Benzo(a)antracene	31,7	385
Crisene	57,1	862
Benzo(a)pirene	31,9	782
Dibenzo(a,h)antracene	6,22*	135*

Tabella 1.1 - “Interim Sediment Quality Guidelines” (ISQGs) e “Probable Effect Levels” (PELs) in $\mu\text{g g}^{-1}$ di sedimento secco per gli IPA a basso peso molecolare (LMW-IPAs) e ad elevato peso molecolare (HMW-IPAs). I valori contrassegnati con il simbolo * sono stati derivati dai valori riferiti ai sedimenti marini (Canadian Council of Ministers of the Environment, 1998).

NP-NPE	ISQG	TEF
NP	1.4	1
NPE (1 < n < 8)	1.4	0.5
NPE (n > 9)	1.4	0.05

Tabella 1.2 - “Interim Sediment Quality Guidelines” (ISQGs) e “Toxic equivalency factors” (TEFs) in mg kg^{-1} di sedimento secco per il nonilfenolo (NP) ed in nonilfenolo etossilato (NPEO) a catena corta (1 < n < 8) e lunga (n > 9) (Canadian Council of Ministers of the Environment, 1998).

Al momento ci sono sufficienti informazioni per ricavare le ISQGs per 13 PAH nei sedimenti marini e 6 PAH nei sedimenti fluviali. Questi includono sette PAH a basso peso molecolare (naftalene, 2-metilnaftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene e antracene) e sei ad elevato peso molecolare (fluorantene, pirene, benzo(a)antracene, crisene, nonché, benzo(a)pirene e dibenzo(a,h)antracene). Insufficienti invece risultano le informazioni per ricavare i relativi valori di ISQG nei sedimenti fluviali per sei PAH a basso peso molecolare (naftalene, 2-metilnaftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene e antracene) e uno ad elevato peso molecolare (dibenzo(a,h)antracene). Per questi PAH vengono al momento adottati i relativi valori di ISQG e di PEL dei sedimenti marini. I livelli di concentrazione tollerabili (ISQG) per il nonilfenolo nel sedimento fluviale che

sono stati stabiliti dalle linee guida sono inferiori rispetto alle concentrazioni riscontrate in test di tossicità, risultando non pericolosi per gli organismi bentonici

1.5.1 Gli idrocarburi policiclici aromatici (PAH)

Gli idrocarburi policiclici aromatici (PAH) costituiscono un'ampia classe di composti xenobiotici, costituiti da due o più anelli benzenici collegati tra loro. Vengono classificati, in funzione del numero di anelli benzenici, in due gruppi, PAH a basso (2-3 anelli) e alto peso molecolare (4-6 anelli). I PAH sono costituenti del petrolio e del carbone e vengono principalmente emessi nell'ambiente come prodotti della loro combustione incompleta. Rappresentano importanti inquinanti del suolo e dei sedimenti e, anche a causa della loro ubiquità e persistenza, risultano potenzialmente pericolosi per l'uomo e per l'ambiente (Fernandez *et al.*, 1992). Le fonti più comuni di PAH nell'ambiente sono di tipo industriale (produzione di alluminio, ferro, acciaio, lavorazioni del carbone e del petrolio, produzione di energia elettrica), urbano (inceneritori, riscaldamento domestico, emissione degli autoveicoli) e naturale come incendi e attività vulcaniche. Queste sostanze possono anche essere prodotte in minima parte da batteri, piante e funghi.

A causa della loro tendenza ad adsorbirsi sul particolato atmosferico, i PAH vengono trasportati a lunga distanza, lontano dalle fonti di emissione, accumulandosi nei diversi comparti ambientali (aria, acqua e suolo) (McDonald *et al.*, 1992; Mazzerà *et al.*, 1999). La deposizione atmosferica è la principale sorgente di diffusione dei PAH negli ecosistemi acquatici con il dilavamento che può contribuire in maniera significativa a veicolare tali inquinanti nei corpi idrici. Tuttavia un'accurata stima dell'*input* totale è estremamente difficile a causa della natura diffusa della contaminazione.

La persistenza dei PAH nell'ambiente è legata alle loro caratteristiche chimico-fisiche come un alto punto di fusione e di ebollizione e una bassa pressione di vapore. Sono molecole idrofobe con un elevato coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($\log K_{ow} > 3$) e per questo motivo tendono ad accumularsi nei sedimenti dove vengono trattenute per tempi lunghi. I fenomeni di turbolenza e le correnti possono favorire la loro risospensione dai sedimenti verso la colonna d'acqua. In particolare i PAH con elevato peso molecolare sono significativamente correlati al particolato organico e inorganico con il quale tendono a instaurare legami tanto più forti se sono di origine pirogenica e se derivano dalla deposizione secca atmosferica.

I PAH a basso peso molecolare, avendo una pressione di vapore relativamente bassa, sono tendenzialmente più volatili di quelli ad elevato peso molecolare. La rimobilizzazione

per volatilizzazione dal suolo è un meccanismo importante per la redistribuzione ambientale di questi composti. In particolare, il naftalene, il composto più volatile e con il valore più basso del coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (3,01-3,7) tende a volatilizzare dal terreno per circa un 30% in 48 ore.

Sebbene questi inquinanti siano presenti nel particolato atmosferico in misura pari all'1%, costituiscono un serio problema per la salute umana poiché molti di essi sono risultati cancerogeni su animali da laboratorio. Gli effetti tossici causati dai PAH infatti sono di tipo cancerogeno, mutageno e tossico (IARC, 1983-1985). In generale i PAH a basso peso molecolare possono procurare una tossicità acuta mentre quelli ad elevato peso molecolare sono cancerogeni. Il composto più tossico tra quelli aventi un effetto cancerogeno accertato è il benzo(α)pirene, costituito da cinque anelli benzenici condensati. La tossicità della maggior parte dei PAH sugli invertebrati acquatici è ormai nota mentre gli effetti sulla comunità microbica sono ancora poco conosciuti.

1.5.1.1 La degradazione dei PAH

I PAH presenti nei diversi comparti ambientali sono soggetti a processi di trasformazione di tipo biotico e abiotico.

In atmosfera e nella colonna d'acqua l'azione di fotossidazione operata dalla luce solare rappresenta il principale fattore di rimozione dei PAH (Hinga, 1980). Una volta trasformati in metaboliti polari, i PAH sono più mobili nei sistemi acquatici e quindi soggetti a processi di mineralizzazione ad opera dei microrganismi. Inoltre i prodotti fotossidati possono fissarsi in maniera irreversibile alla matrice del suolo e dei sedimenti e lì depositarsi (Varanasi, 1989).

Gli studi sulla degradazione dei PAH sono iniziati nei primi anni del '900 quando Stormer (1908) e Sohngen (1913) isolarono batteri capaci di utilizzare esclusivamente gli idrocarburi aromatici come risorsa di carbonio. Oggi si conosce un'ampia varietà di microrganismi in grado di degradare i PAH con meccanismi praticamente simili tra loro.

I PAH con più di tre anelli benzenici, di origine pirogenica, non possono essere degradati direttamente dai microrganismi a causa della complessità della loro struttura, ma possono essere degradati grazie a processi cometabolici (Dagley, 1971).

Le informazioni genetiche che codificano la degradazione dei PAH è associata ai plasmidi e ciò consente ai batteri di sviluppare anche una grossa capacità di adattamento a basse esposizioni (Williams, 1981).

Dalla degradazione degli idrocarburi i batteri ricavano sia energia che piccole molecole (C2-C4) da utilizzare per i processi di biosintesi. In linea generale però, perché un anello aromatico possa essere completamente mineralizzato, è necessario che a partire da esso si formi un intermedio meno stabile che, dopo ulteriori modificazioni, potrà entrare nel ciclo degli acidi tricarbossilici. Nel caso degli idrocarburi policiclici aromatici queste reazioni interessano un anello per volta (Varanasi, 1989). La degradazione degli idrocarburi policiclici aromatici può avvenire sia in ambiente aerobico che anaerobico.

Nella degradazione aerobica gli anelli aromatici vengono convertiti, attraverso delle vie periferiche, in una forma intermedia recante due gruppi ossidrilici. Successivamente intervengono enzimi della classe delle ossigenasi che introducono una o più molecole di ossigeno nel substrato rompendone così la struttura ciclica e rendendolo più reattivo (Fig. 1.11). Infine la molecola viene incanalata attraverso vie di degradazione che convergono verso il ciclo degli acidi tricarbossilici con formazione di CO_2 e NADH.

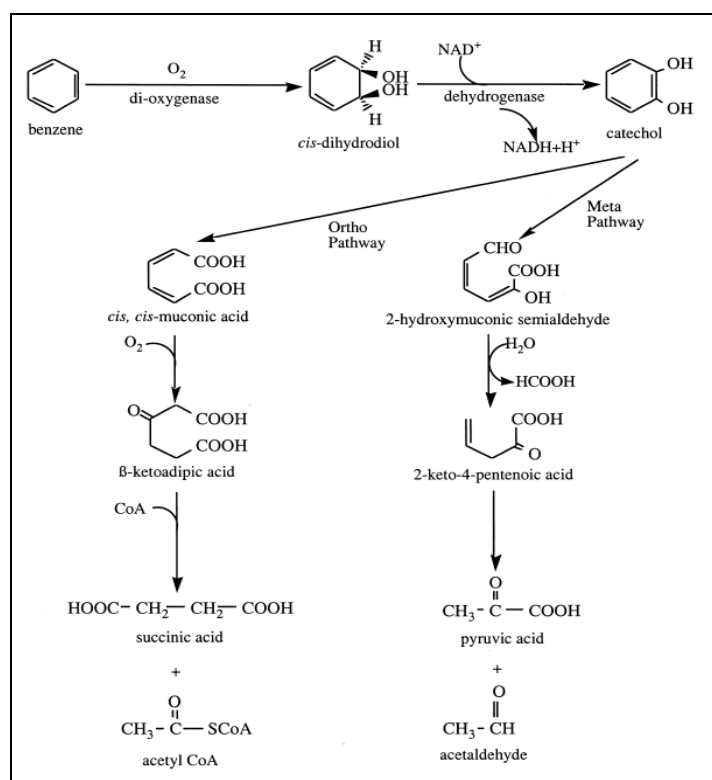


Figura 1.8 - Esempio di ossidazione di un anello aromatico in ambiente aerobico (Cerniglia, 1984; Rochkind-Dubinsky *et al.*, 1987).

Nella degradazione anaerobica, invece, l'anello aromatico viene convertito in benzoil-CoA dalle vie periferiche. Questa molecola può essere considerata l'intermedio centrale della via degradativa così come lo sono i composti diidrossilati per il metabolismo

aerobico. Successivamente il benzoil-CoA perde la sua aromaticità subendo una progressiva riduzione dei doppi legami e, mediante l'addizione di una molecola di acqua, si forma un chetone che funge da substrato per l'apertura della molecola ciclica grazie a una reazione idrolitica. Questa via metabolica porta alla formazione di un acido grasso che può essere ulteriormente metabolizzato in un processo analogo a quello dell'acetil-CoA.

Esistono due principali tipi di ossigenasi, ognuna con una funzione diversa. Le monossigenasi (o ossigenasi a funzione mista), di origine eucariotica, introducono un singolo atomo di ossigeno nel substrato mentre il secondo viene ridotto ad acqua. Le diossigenasi, invece, introducono entrambi gli atomi di ossigeno sul substrato e sono prevalentemente di origine procariotica.

1.5.2 Il nonilfenolo

Il nonilfenolo possiede una struttura molecolare costituita da una catena alchilica con nove atomi di carbonio legata ad un anello fenolico. Le forme isomeriche del nonilfenolo differiscono per il grado di ramificazione della catena alchilica e per la posizione dell'anello fenolico. I nonilfenoli etossilati (NPE) sono costituiti da un gruppo fenolico legato ad una catena carboniosa alchilica ed etossilata. Questi composti sono anfipatici, poiché sono costituiti per metà da una componente idrofoba rappresentata dalla catena alchilica, e da una parte idrofila costituita dalla catena di etossilato. Il nonilfenolo è utilizzato principalmente per produrre NPE, e come coformulante nei pesticidi, lubrificante negli oli additivi e catalizzatore nei processi di solidificazione delle resine epossidiche (CIS 1990; Lorenc *et al.*, 1992). I nonilfenoli etossilati (NPE) sono stati utilizzati come agenti tensioattivi, emulsificatori, disperdenti e imbibenti in varie applicazioni industriali e nei prodotti di consumo.

Questi contaminanti giungono nell'ambiente acquatico attraverso lo scarico delle acque urbane e industriali. Nell'ambiente terrestre, le maggiori vie di diffusione sono dovute all'uso dei pesticidi che contengono sia NP sia NPE, attraverso lo smaltimento in discarica dei fanghi, e l'utilizzo in agricoltura dei fanghi di depurazione o della polpa prodotta dalle cartiere. Il dilavamento dei terreni trasporta questi inquinanti nell'ambiente acquatico, in cui si adsorbono alle particelle sospese, che si accumulano sulla superficie dei sedimenti a causa delle loro proprietà idrofobe ($\log K_{ow} > 3$). I nonilfenoli ed i nonilfenoli etossilati con catena carbossilica corta sono più idrofobi di quelli a catena lunga e tendono ad assorbirsi maggiormente alle particelle di sedimento. I composti a catena lunga interagiscono con la sostanza organica mediante la parte idrofoba della molecola (catena

alchilica) e con la componente minerale del sedimento mediante la parte idrofila (catena etossilica) (John *et al.*, 2000).

Il nonilfenolo e gli omologhi etossilati a catena corta sono stati riscontrati ad elevate concentrazioni nei sedimenti di fiumi caratterizzati da un elevato contenuto di sostanza organica (Ahel *et al.*, 1994). Il nonilfenolo ed il nonilfenolo etossilato con catena corta risultano molto persistenti in natura (Ahel *et al.*, 1994a; Montgomery-Brown *et al.*, 2003) ed interferiscono con il sistema riproduttivo degli organismi acquatici e dei mammiferi mimando la funzione degli ormoni estrogeni e legandosi ai recettori (Renner 1997; Lin e Janz 2006). Gli inquinanti che causano questi effetti di disturbo sono definiti interferenti endocrini. A causa della loro persistenza nell'ambiente e degli effetti tossici, questi composti sono stati banditi in molti paesi. Dal 2000, l'Unione Europea ha iniziato a vietare gradualmente l'uso di questi composti nei prodotti di consumo, per pervenire entro il 2020 alla loro completa eliminazione dai processi produttivi.

1.5.2.1 La degradazione del nonilfenolo

Il nonilfenolo in atmosfera reagisce con i radicali idrossilici subendo un'iniziale fase di degradazione. Nell'ambiente acquatico il nonilfenolo ed i suoi derivati vanno incontro a processi di degradazione abiotica come la fotolisi e l'idrolisi. Ahel *et al.* (1994) riporta un dimezzamento della concentrazione del nonilfenolo nello strato superficiale di acqua in seguito all'azione della luce solare, mentre l'idrolisi del nonilfenolo risulta essere trascurabile (EU Risk Assessment, 2002).

La degradazione biologica sia del nonilfenolo che del nonilfenolo etossilato avviene più efficacemente in condizioni aerobiche ed è dipendente dalla temperatura (Ying *et al.*, 2002). L'ossigeno gioca un ruolo fondamentale nella degradazione del nonilfenolo etossilato e la fase terminale di degradazione avviene in condizioni anaerobiche. Nella figura 1.9, sono mostrate le vie di degradazione del nonilfenolo etossilato in condizioni aerobiche ed anaerobiche (Lu *et al.*, 2009).

La degradazione biologica del NP e dei suoi derivati è stata osservata nei sedimenti, nei suoli, negli impianti di trattamento ed è principalmente attuata dai consorzi batterici (Corvini *et al.*, 2006). 37 batteri capaci di degradare il nonilfenolo ed i suoi derivati sono stati isolati in diversi ambienti (sedimenti, fanghi di depurazione, fanghi attivi) in condizioni aerobiche ed anaerobiche (Yuan *et al.*, 2004; Corvini *et al.*, 2006).

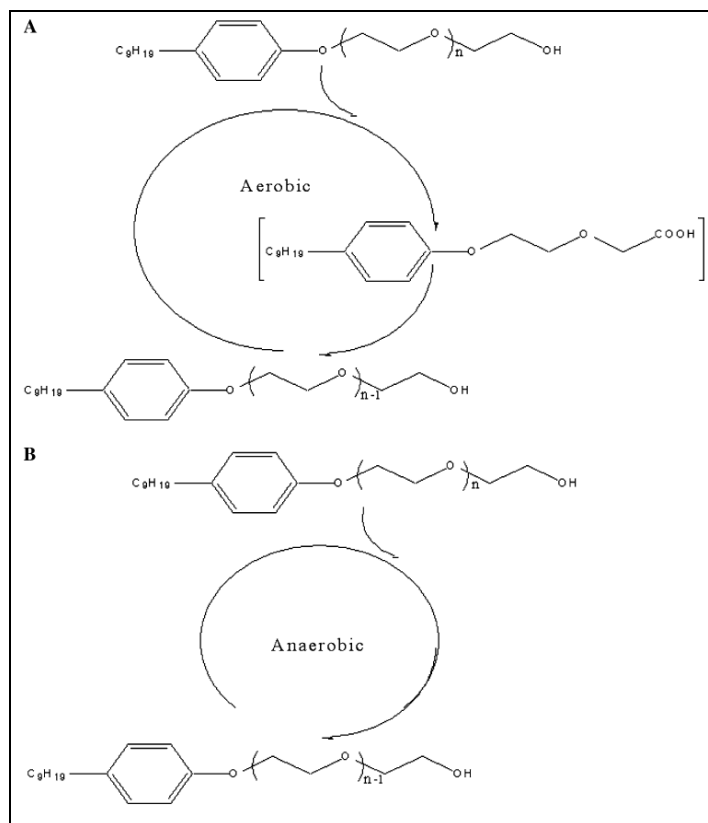


Figura 1.9 - Esempio di degradazione del noninfenolo etossilato in condizioni aerobiche (a) ed anaerobiche (b) (Lu *et al.*, 2009).

I batteri appartenenti a questo gruppo sono: *Acinetobacter baumannii*, *Arthrobacter nicotianae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus horikoshii*, *Bacillus sphaericus*, *Corynebacterium sp.*, e *Pseudomonas sp. strain JCI*. I batteri con le maggiori potenzialità di degradazione del NP sono appartenenti al genere *Sphingomonas*, che ha la capacità di crescere utilizzando come un'unica fonte di carbonio il NP (Corvini *et al.*, 2006). Secondo alcuni autori, la degradazione del NP e dei suoi derivati inizia con la scissione dell'anello aromatico (Tanghe *et al.*, 1999; deVries *et al.*, 2001; Fujii *et al.*, 2001). Mentre secondo Corvini *et al.* 2004, avverrebbe un iniziale distacco della catena alchilica con conseguente rottura dell'anello fenolico e con possibile decarbossilazione.

1.6 Obiettivo del lavoro

La Direttiva Europea 2006/60/CE presta attenzione allo stato ecologico dei corpi idrici e pone dei limiti applicativi ai fiumi a regime temporaneo, frequenti nella Regione Mediterranea. La classificazione abituale secondo la presenza/assenza di indicatori biologici non può essere applicata ad esempio nei periodi siccità così come non vengono considerate le modificazioni dei processi biologici in assenza di flusso. In generale si può

dire che sussiste una significativa carenza di informazioni di tipo ecologico ed idrologico riguardo questi sistemi.

La Comunità Europea ha finanziato recentemente progetti come TempQsim (*Evaluation and improvement of water quality models for application to temporary waters in southern european catchments*) e MEDALUS (*Mediterranean Desertification and Land Use*) con l'obiettivo di migliorare le conoscenze sui cicli biogeochimici in aree del Mediterraneo a rischio siccità. Più recentemente è stato finanziato il Progetto MIRAGE (*Mediterranean Intermittent River manAGEment*, FP7-ENV-2007-1,GA 211732), che si è svolto tra il 2009 e il 2011, con lo scopo principale di fornire gli strumenti necessari ad una migliore valutazione dell'integrità ecologica dei corsi d'acqua temporanei.

Il Progetto conta della partecipazione di 17 Enti di ricerca europei ed extra europei (paesi mediterranei dell'Africa settentrionale). La selezione dei siti da sottoporre allo studio è guidata soprattutto dal bisogno di rappresentare al meglio i paesi dell'Europa meridionale nonché le differenti problematiche riscontrati in essi. I siti selezionati dal Progetto MIRAGE sono sette, distribuiti in diversi paesi dell'area mediterranea, di cui uno collocato in Italia e precisamente nella regione Puglia (Fig. 1.10). La natura improvvisa degli eventi di piena e di secca di questi fiumi, genera dei problemi dal punto di vista della gestione e della qualità della risorsa idrica. Attualmente nei piani di gestione non viene considerato l'impatto sull'ambiente dell'accumulo di inquinanti nei sedimenti e il loro improvviso rilascio in conseguenza al primo evento di pioggia.



Figura 1.10 - I fiumi presi in esame nel progetto MIRAGE

Le odierne conoscenze su questi ambienti fluviali sono ancora insufficienti per una loro corretta gestione, e necessitano informazioni sul destino delle sostanze inquinanti nelle diverse condizioni di flusso, le interazioni tra la sostanza organica, inclusi gli inquinanti, e la comunità biologica nelle diverse fasi idrologiche.

La presente Borsa di Dottorato è stata finanziata dal Progetto Europeo MIRAGE con lo scopo di fornire informazioni sulle relazioni tra le condizioni idrologiche ed il ciclo della sostanza organica mediata dalle comunità microbiche. In particolare, gli obiettivi della tesi di dottorato sono inseriti nell'attività sperimentale del *Work Package 7 (Hazardous substances)*, coordinato dall'Istituto di Ricerca Sulle Acque del CNR, il cui obiettivo è stato caratterizzare i siti per la presenza di determinati inquinanti, ritenuti prioritari dalla Direttiva Europea 2006/60/CE, verificare la loro distribuzione nei sedimenti nelle diverse fasi di flusso, studiarne le interazioni con la comunità microbica e fornire quindi informazioni per il miglioramento dei piani di monitoraggio nonché delle procedure di valutazione della qualità delle acque. Nell'ambito del Progetto sono state testate, in condizioni controllate di laboratorio, gli effetti dei periodi di siccità sulla trasformazione della sostanza organica.

L'obiettivo finale è quello di fornire alle Autorità locali, competenti per la tutela dei corpi idrici e della salute umana, gli strumenti per una corretta gestione dei corsi d'acqua temporanei.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Descrizione del sito di studio: il bacino idrografico del fiume Candelaro

Il bacino idrografico del fiume Candelaro è situato nella parte settentrionale della Puglia, circondato dagli Appennini e dal promontorio del Gargano. L'area del bacino si estende per circa 2500 km² con un perimetro di 250 Km, e poggia su una struttura a prevalenza calcareo-dolomitica. Il principale corso d'acqua, che dà il nome al bacino idrografico, nasce nelle vicinanze di San Paolo di Civitate (FG), fluendo ai piedi del Gargano in direzione NW-SE per circa 70 Km e sfociando nel Mare Adriatico nelle vicinanze del Golfo di Manfredonia. Nel versante sinistro del bacino, si distribuiscono la maggior parte degli affluenti, tra cui i più importanti sono i fiumi Celone, Salsola e Triolo, che iniziano il loro percorso dal Subappennino Dauno in direzione SW-NE, immettendo le loro acque circa a metà del corso del fiume Candelaro.

Il regime idrologico del bacino è fortemente soggetto ad un'elevata variabilità idrologica, caratterizzata da periodi di siccità che si alternano con periodi di piene improvvise. L'idrologia del bacino è influenzata dal clima tipicamente mediterraneo, caratterizzato da estati aride e calde ed inverni freddi, durante i quali le temperature raggiungono valori prossimi agli 0 °C nella maggior parte del bacino. Le precipitazioni (mediamente 500 mm per anno) si concentrano tra Ottobre ed Aprile, alimentando il flusso d'acqua del bacino che raggiunge il massimo di portata nei mesi di Febbraio e Marzo (31,6 m³ s⁻¹). I livelli più alti di evapotraspirazione (900-1000 mm) si manifestano tra Maggio ed Ottobre, causando una riduzione del flusso idrico sino alla completa cessazione.



Figura 2 - Collocazione delle stazioni campionate: stazione 1 (fiume Celone – località Castelluccio Valmaggiore, FG); stazione 2 (fiume Celone - località Masseria Pirro); stazione 3 (fiume Candelaro – località P.te Candelaro SP 60).

Studi pluviometrici hanno dimostrato come il territorio in questione sia stato interessato da una diminuzione delle precipitazioni (circa il 30%) e da un aumento delle temperature (0,5 °C) negli ultimi 40 anni, aumentando il rischio di desertificazione (Barca *et al.*, 2006).

L'area del bacino è caratterizzata da attività agricole prettamente intensive nella zona più pianeggiante, a differenza delle zone collinari, con morfologia irregolare, in cui è diffusa la pastorizia.

Nel bacino si contano 24 insediamenti urbani tra i quali la città di Foggia, per una densità abitativa media di 300 abitanti/km². Le acque provenienti dagli impianti di depurazione rappresentano la maggiore fonte di inquinamento in quanto inadeguati ai carichi, provenienti anche dalle industrie alimentari. Inoltre, altre fonti di inquinamento provengono dall'elevato uso di fertilizzanti e pesticidi in particolare nelle attività agricole di tipologia intensiva. I numerosi interventi di ingegneria idraulica, effettuati per fronteggiare il pericolo di esondazioni, hanno portato alla scomparsa della fascia tampone costituita dalla vegetazione ripariale.

2.2 Campionamento

Nel bacino idrografico del fiume Candelaro sono stati prelevati campioni di acqua e sedimento in tre stazioni, indicate come 1, 2 e 3 e distribuite da monte a valle del bacino idrografico, in maniera tale da rappresentare aree a diverso impatto antropico. I periodi di campionamento sono stati programmati in funzione della loro rappresentatività di diverse fasi idrologiche. Nella figura 2.1, sono rappresentate le variazioni mensili della portata nel stazione 1 (stazione Castelluccio Valmaggiore) simulata dal modello Soil and Water Assessment Tool -SWAT sui dati raccolti nel stazione 2 (Arnold *et al.*, 1998; Lo Porto *et al.*, 2010).

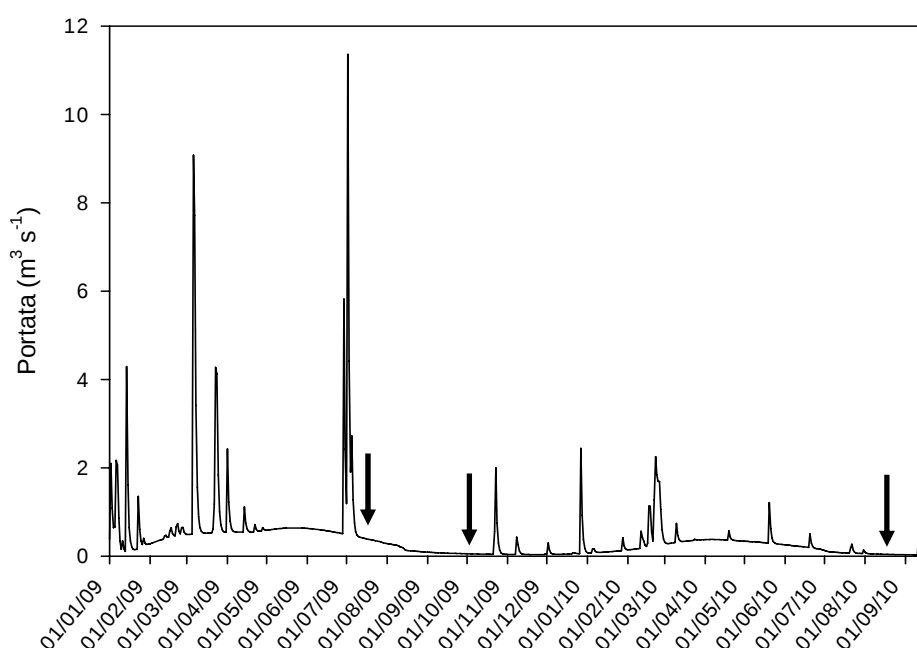


Figura 2.1 - Portata del fiume Celone (stazione 1) nel periodo 2009-2010 elaborati mediante il modello SWAT, (dati gentilmente concessi da A. De Girolamo CNR-IRSA, Bari).

Sulla base di questa elaborazione si distinguono due principali fasi idrologiche. Nel periodo tra l'inverno e la primavera si registrano portate medio-alte (media $1,71 \pm 0,65$ e $1,28 \pm 7,18 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ rispettivamente nelle due stagioni) ed un periodo estivo - autunnale caratterizzato da portate ridotte o assenti ($0,25 \pm 0,43$ e $0,33 \pm 0,55$). La strategia di campionamento utilizzata in questa indagine comprende tre diverse fasi idrologiche.

I sedimenti campionati a luglio 2009 sono rappresentativi di fasi di portata medio-alta (portata media $1,05 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) e successiva ad un picco istantaneo. Nel mese di ottobre 2009 il fiume è stato soggetto ad una significativa restrizione della portata (portata media $0,16 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$), per cui nella stazione 1, il flusso d'acqua risultava disperso in rivoli, lasciando

scoperte ampie aree di sedimento. Queste particolari condizioni hanno consentito di campionare ed analizzare porzioni di sedimento adiacenti a diverso contenuto di acqua, dalla saturazione ad un'idratazione del 7%. Il campionamento di Agosto 2010 è avvenuto in un periodo di siccità, in cui il sedimento della stazione 1 risultava completamente emerso ed essiccato, esposto all'aria e ai raggi solari da diverse settimane.

I sedimenti sono stati prelevati in tre stazioni (Fig. 2). La stazione 1 (Castelluccio Valmaggiore, N 41° 29' 44,6" E 15° 15' 18,3") è collocata a monte della città di Foggia in una zona collinare ed insieme alla stazione 2 (Masseria Pirro, N 41° 23' 43,5" E 15° 19' 57,3") è localizzata lungo il corso del fiume Celone. La stazione 3 (P.te Candelaro SP 60, N 41° 32' 49,4" E 15° 48' 30,59") è collocata sul fiume Candelaro a valle del punto di confluenza del fiume Celone. Come mostrato nella figura 2.2 nella stazione 1, durante il campionamento di Ottobre, il flusso d'acqua copriva la zona centrale del letto del fiume, lasciando lateralmente aree costituite da pozze ed aree emerse con sedimento umido o secco.



Figura 2.2 - Stazione 1 (Castelluccio) durante il campionamento di ottobre, in cui è visibile il letto del fiume parzialmente coperto di acqua, con pozze (in alto a destra) e porzioni di sedimento secco (sinistra) e umido (destra).

Il sedimento è stato campionato escludendo lo strato anossico ed evitando gli strati di biofilm presenti nella parte superficiale del sedimento. Una volta campionato, il sedimento è stato sottoposto a setacciamento utilizzando un setaccio con una maglia inferiore a 2 mm per eliminare la frazione più grossolana. La frazione < 2 mm è considerata la frazione fine del sedimento dove risiede la maggior parte dell'attività microbica (Fisher e Pusch, 2001).

I campioni sono stati quindi posti in barattoli di policarbonato lavati in acido. Sono stati mantenuti al buio e alla temperatura di 4°C fino al momento delle analisi effettuate entro le 24 ore dal campionamento.

2.3 Caratterizzazione del sedimento

2.3.1 Analisi granulometrica

L'analisi granulometrica dei sedimenti è stata condotta seguendo le indicazioni del “*soil textural triangle*” (Gerakis e Baer, (1999). Il sedimento è stato distinto in classi granulometriche setacciando la frazione fine (<2mm) attraverso setacci di maglie di diverse dimensioni (tabella 3.1).

2.3.2 Peso secco

Il peso secco del sedimento è stato determinato essiccando quantità note (circa 2-3 g) di sedimento umido in stufa a 105°C per 24 ore. Dopo il raffreddamento in essiccatore, il sedimento è stato di nuovo pesato. La differenza tra il peso del sedimento umido e secco, al netto della tara, costituisce il contenuto di umidità. La restante parte, invece, rappresenta il peso secco che viene espresso come percentuale di quello umido. In seguito, il sedimento secco è stato posto in muffola alla temperatura di 500°C per tre ore per determinare il peso delle ceneri. La differenza tra il peso secco e le ceneri rappresenta il peso della sostanza organica totale.

2.3.3 Analisi chimiche

Il contenuto di carbonio e di azoto è stato analizzato mediante un analizzatore CHN (Flash EA 1112 series) acidificando i campioni con HCl (1N) per eliminare la componente inorganica.

Gli idrocarburi policiclici aromatici (PAH, Fig. 2.3) sono stati analizzati tramite HPLC. La metodica utilizzata è la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rivelatore a fluorescenza. Il riconoscimento e la quantificazione dei singoli PAH è basata sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi del cromatogramma ottenuto dall'analisi dell'estratto organico del campione con quelli ottenuti dall'analisi di idonee soluzioni di riferimento. Infine la determinazione quantitativa viene effettuata misurando le aree dei rispettivi picchi cromatografici sulla base di opportune rette di taratura (APAT e IRSA-CNR, 2003).

Le soluzioni di riferimento per la preparazione della curva di taratura sono state preparate a cinque concentrazioni diverse di ogni singolo composto da analizzare in modo tale da coprire l'intero campo di indagine analitica (0,01 – 1 mg L⁻¹).

L'analisi del contenuto di PAH nel sedimento è stata effettuata attraverso una fase preliminare di estrazione degli analiti da 1 g di sedimento essiccato, che prevedeva a sonicazione con opportuni solventi (acetone e esano in rapporto 1:1) in triplo. L'estratto finale è stato concentrato in Rotavapor e successivamente ripreso in una provetta a punta per essere evaporato a goccia sotto flusso di N₂ e ricostituito ad un volume finale di 1 mL con una miscela di H₂O:Acetonitrile (40:60).

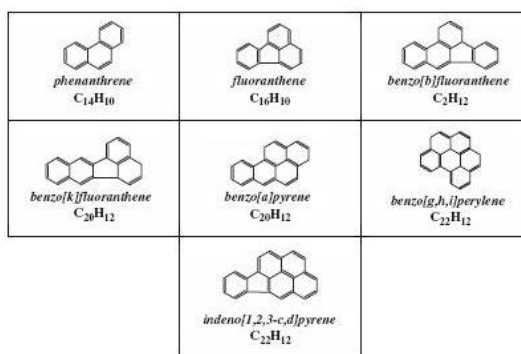


Figura 2.3 - Struttura molecolare analizzati.

Le soluzioni di riferimento e l'estratto finale del campione sono state iniettate nel cromatografo liquido ad alta prestazione (HPLC) accoppiato ad un rivelatore a fluorescenza a lunghezza d'onda programmabile, e utilizzando un flusso della fase mobile di 1,5 mL min⁻¹. In questo modo è stato possibile selezionare opportuni valori di lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione per ogni singolo composto analizzato, aumentando la selettività delle misure.

A titolo esemplificativo si riportano le relative lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione ed i relativi tempi di ritenzione nella colonna (tabella 2).

Composto	Tempo di ritenzione (minuti)	Fluorescenza (eccit. - emiss.)
Fenantrene	8,96	265 - 389
Fluorantene	11,49	250 - 460
Benzo(b)fluorantene	20,65	290 - 418
Benzo(k)fluorantene	22,10	290 - 418
Benzo(a)pyrene	23,91	290 - 418
Benzo(g,h,i)perylene	27,84	290 - 418
Indeno(1,2,3-c,d)pyrene	28,43	290 - 490

Tabella 2 - Tempi di ritenzione e lunghezze d'onda (eccitazione ed emissione) dei PAH analizzati.

In figura 2.4 è riportato un cromatogramma semplificato dei sette composti analizzati. Per il calcolo delle concentrazioni, le aree dei picchi dei PAH sono state confrontate con quelle delle soluzioni di riferimento utilizzate per la retta di taratura.

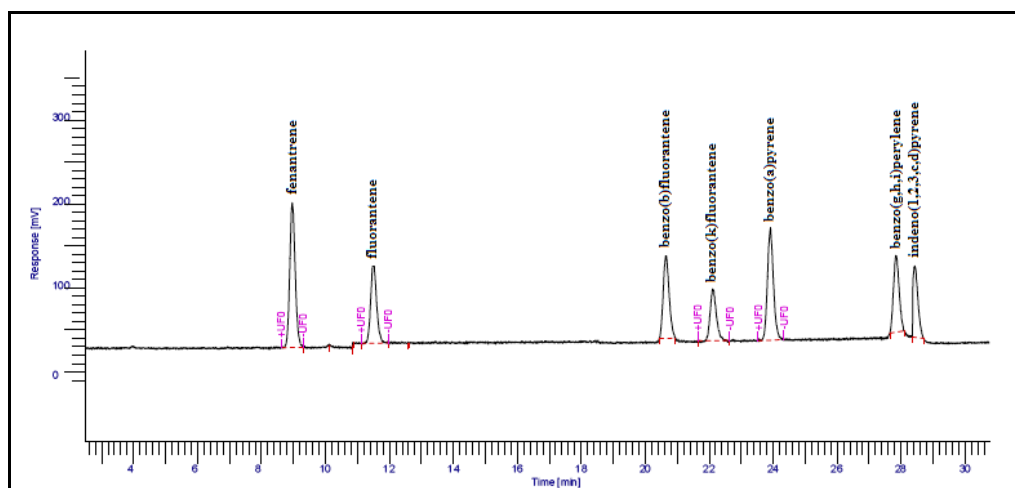


Figura 2.4 - Esempio di cromatogramma dei sette PAH analizzati

2.4 Analisi effettuate sulla comunità microbica bentonica

2.4.1 Misura delle abbondanze batteriche

L'abbondanza batterica è determinata comunemente attraverso il conteggio delle cellule su piastra o MPN (Most Probable Number), la conta diretta al microscopio ad epifluorescenza o attraverso la citometria a flusso usando coloranti specifici. Il metodo tradizionale delle conte su piastra risultando affetto da errori causati dai fenomeni legati alla vitalità cellulare, alla selettività del mezzo di coltura e alla coltivabilità stessa di alcuni ceppi batterici, è stato superato dal metodo di conta diretta al microscopio ad epifluorescenza e dalla citometria a flusso.

La misura dell'abbondanza delle cellule batteriche permette la stima della biomassa, indispensabile per una migliore comprensione del ruolo delle comunità microbiche nel trasferimento del carbonio dalla fase disciolta alla biomassa batterica e quindi alla catena trofica. La biomassa può essere stimata attraverso l'applicazione di un fattore di conversione che attribuisce un contenuto medio di carbonio/cellula pari a $20 \cdot 10^{-15}$ g (Lee e Fuhrman, 1987). La misura della biomassa può essere inoltre effettuata in maniera più precisa attraverso l'analisi di immagine di cellule colorate con DAPI o acridine orange (Bloem *et al.*, 1995; Massana *et al.*, 1997; Shopov *et al.*, 2000).

Nella presente indagine l'abbondanza cellulare è stata misurata mediante conta diretta al microscopio ad epifluorescenza mediante l'utilizzo del fluorocromo specifico 4',6-

Diamidino-2-fenilindolo diidroclore (DAPI). Il DAPI forma un complesso fluorescente quando va a legarsi alle sequenze nucleotidiche ricche di A-T nelle scanalature inferiori della conformazione B del dsDNA (Kapuscinski, 1995).

L'osservazione al microscopio ad epifluorescenza dei campioni di sedimento o di suolo è disturbata dalla presenza di particelle di detrito e di materiale di vario genere che mascherano il segnale fluorescente, e alle quali sono attaccate la maggiore parte delle cellule batteriche (Daims e Wagner, 2007; Rogers *et al.*, 2007). In particolare nei sedimenti fini e argillosi, la quantità di particelle può superare di diversi ordini di grandezza il numero delle cellule batteriche, che sono legate al sedimento tramite legami deboli, causando una sottostima della conta batterica. È quindi necessario utilizzare dei metodi di distacco delle cellule batteriche dalle particelle di suolo per ottenere una corretta misura dell'abbondanza batterica.

Generalmente i metodi di estrazione utilizzano una combinazione di trattamenti chimici e fisici al fine di ottenere il distacco delle cellule dal substrato, senza influenzare l'integrità delle membrane cellulari. In particolare, dal punto di vista chimico, agenti chelanti quali sali di sodio (ossalato, pirofosfato, citrato) e resine (es. amberlite) sono molto utilizzati per indebolire i legami idrogeno e le forze elettrostatiche che legano insieme cellule e particelle di detrito. L'utilizzo di questi composti in associazione con sostanze detergenti (Sodio-dodecilsolfato, Sodio-colato, Tween-Series, Triton-X) si è dimostrato particolarmente efficace nel separare in modo ottimale le cellule dal detrito (Katayama *et al.*, 1998). Dal punto di vista fisico, il distacco delle cellule viene normalmente effettuato tramite agitazione meccanica (vortex, agitatori, miscelatori) e processi di sonicazione (bagni e sonde ad ultrasuoni). Una volta staccate le cellule dalle particelle si procede alla fase di separazione. Diversi autori hanno suggerito di impiegare la centrifugazione su gradiente di densità, utilizzando una soluzione non-tossica a concentrazione nota di Nycodenz (Lindhal, 1996; Courtois *et al.*, 2001; Fazi *et al.*, 2005; Amalfitano *et al.*, 2008, Amalfitano *et al.*, 2009). Il Nycodenz è un derivato dall'acido benzoico, tradizionalmente utilizzato in campo biomedico per la separazione di particelle biologiche *in vitro* (Rickwood *et al.*, 1982).

Il campione di sedimento prelevato e setacciato *in situ* su maglia da 2 mm è stato fissato utilizzando una soluzione di formaldeide al 37% (conc. finale 2%). Un'aliquota di sedimento (1 g) è stata pesata in una fiala da 15 mL nella quale sono stati aggiunti 10 mL di una soluzione contenente PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH =

7.4), sodio pirofosfato (conc. finale 1 g L^{-1} ; Sigma-Aldrich) e Tween80 (conc. finale 0,5%; Research Organics Inc.).

Successivamente il campione è stato agitato per 15 minuti a 300 giri al minuto su agitatore orbitale (IKA KS 130 Basic), sonicato in bagno di ghiaccio per 1 minuto a 20 W utilizzando un processore liquido ad ultrasuoni (Misonix XL2000 con punta in titanio da 3.2 mm di diametro).

Dall'emulsione ottenuta è stato prelevato un millilitro e trasferito in microprovette da 2 mL, nel cui fondo è stato introdotto 1 mL di Nycodenz con l'ausilio di una siringa munita di ago. Subito dopo le provette sono state centrifugate a 14000 giri per 90 minuti (centrifuga 5804R, Eppendorf), mantenendo la temperatura a 4°C .

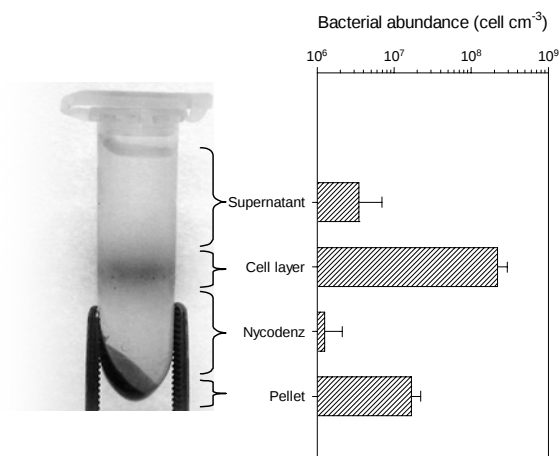


Figura 2.5 - Procedura di separazione delle cellule dal sedimento: campione dopo centrifugazione con aggiunta di Nycodenz e abbondanze batteriche medie ($\pm$ d.s.) nei diversi strati (Amalfitano, 2007).

Dopo la centrifugazione è visibile una separazione di fasi (Fig. 2.5), in cui le cellule batteriche si trovano concentrate nello strato posto al di sopra della fascia di Nycodenz e possono così facilmente essere prelevate con una pipetta.

La combinazione delle procedure di separazione rende il campione quasi del tutto privo di particelle di sedimento, migliorando e facilitando le osservazioni sia al microscopio che al citometro.

Una quota di surnatante (500 μL) è stata prelevata e incubata con 10 μL di DAPI (Vector Laboratories) 1/10 (v/v) al buio per 10 min (conc. finale $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Porte e Feig, 1980) e concentrata su un filtro nero in polycarbonato (porosità da 0,2 μm , Nucleopore), tramite l'utilizzo di una pompa a vuoto ($<0,2$ bar). Successivamente, il filtro è stato montato su un vetrino da microscopio ed è stato osservato utilizzando un microscopio ad

epifluorescenza dotato di lampada a vapori di mercurio, filtro dicroico UV, oculare con ingrandimento 10X ed obiettivo ad immersione 100X. Per ogni campione sono state contate un minimo di 300 cellule su più campi selezionati in modo casuale e distribuiti su tutta l'area del filtro (Kirchman, 1993). Conoscendo, per il sistema ottico utilizzato, il rapporto tra la superficie di filtrazione effettiva e la porzione di griglia osservata, si è risalito al numero di cellule sull'intero filtro e da questo, in base al volume di campione filtrato, alla concentrazione di cellule nel surnatante (Zoppini *et al.*, 2002):

$$\text{N}^{\circ} \text{ cellule} / \text{g dw} = (M (A_f/A_c) (10/V_f)) / (\text{pu} \% \text{ ps})$$

M = media delle cellule contate

A_f = area filtro (μm)

A_c = area campo (μm)

10 = fattore di diluizione con soluzione B (mL)

V_f = volume filtrato (mL)

pu = peso umido sedimento

% ps = percentuale peso secco

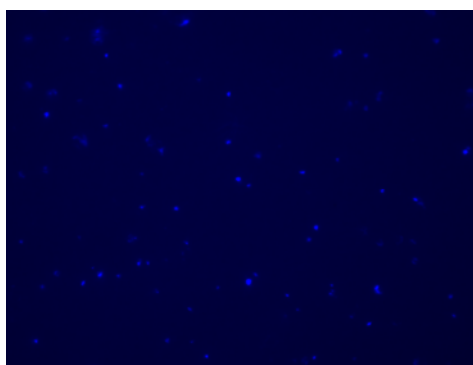


Fig. 2.6 - Immagine ottenuta al microscopio ad epifluorescenza di cellule batteriche colorate con DAPI (100X).

2.4.2 Misura del numero di spore

La disponibilità di acqua allo stato liquido è fondamentale per i microrganismi poiché garantisce la loro sopravvivenza e la biodisponibilità dei nutrienti. La strategia più comunemente adottata per far fronte allo stress idrico è la formazione di spore. In concomitanza con lo studio sulla risposta della comunità batterica alla reidratazione del sedimento è stato eseguita la misura dell'abbondanza delle spore nel sedimento secco e reidratato.

Le spore sono state identificate mediante la colorazione con verde di malachite (Schaeffer e Fulton, 1933), utilizzando opportuni adattamenti alla matrice del sedimento.

Un'aliquota di sedimento secco (10 g), campionato nel mese di agosto 2010, è stata reidratata con 5 mL di acqua (MilliQ). Il campione è stato agitato per 15 min a 300 rpm, sonicato per 1 min a 20 Watt, e agitato nuovamente. Dopo aver atteso 5 min per la sedimentazione, è stato prelevato il surnatante per stimare l'abbondanza batterica (DAPI) e la presenza di spore.

Per il conteggio delle spore, un'aliquota di surnatante (50 µl) è stata posta all'interno del pozzetto di un vetrino ed è stata asciugata all'aria. Un pezzo di carta bibula è stata posta su tutta la superficie del vetrino ed impregnata con poche gocce di soluzione acquosa di verde di malachite (5%). La superficie del vetrino è stata scaldata 3-4 volte per 5 minuti utilizzando la fiamma di un Becco Bunsen. Il calore riduce la resistenza delle spore permettendo l'ingresso del verde di malachite all'interno della spora stessa.

Successivamente, la carta bibula è stata tolta delicatamente dal vetrino che è stato lavato moderatamente con acqua distillata per eliminare il colorante in eccesso. Una doppia colorazione con la safranina permette di distinguere le cellule vive dalle spore. La safranina riesce infatti a penetrare solo all'interno delle cellule vive, permettendo così la distinzione delle spore colorate in verde dalle cellule colorate in rosso. La superficie del vetrino è stata coperta con una soluzione di safranina (0.5%) per 2 minuti e in seguito lavata moderatamente con acqua distillata. Il conteggio delle spore è stato eseguito al microscopio ottico ad immersione (100X).

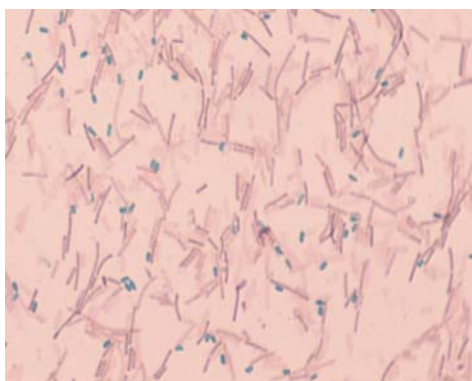


Fig. 2.7 - Immagine di spore ottenuta al microscopio ottico ad immersione (100X) attraverso la colorazione con verde di malachite (spore) e safranina (cellule rosa vive).

2.4.3 Stima della biomassa totale vivente (ATP)

La conoscenza delle dinamiche riguardanti le comunità microbiche è indispensabile per la comprensione dei meccanismi e della regolazione dei cicli biogeochimici. Le misure

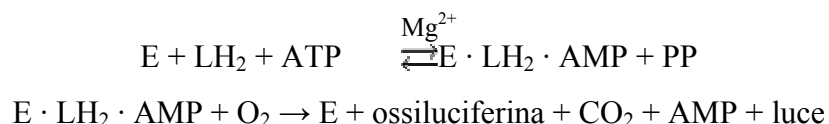
di biomassa microbica permettono di stimare la quantità di energia immagazzinata e potenzialmente disponibile per i livelli superiori della rete trofica. La misura della concentrazione di ATP in campioni naturali rappresenta una stima di biomassa totale vivente in quanto è un componente comune a tutte le cellule vive sia autotrofe che eterotrofe.

I nucleotidi adenosinici, in special modo l'adenosintrifosfato (ATP), sono trasportatori e intermediari di energia chimica all'interno delle cellule e giocano un ruolo centrale nel legare il catabolismo alla biosintesi. Essi, più che un meccanismo di stoccaggio dell'energia potenziale costituiscono un sistema di rapida mobilizzazione dell'energia chimica cellulare e quindi utilizzate come indice di presenza di cellule vive. L'ATP infatti si denatura rapidamente dopo la morte delle cellule. E' stata dimostrata, infatti, una rapida idrolisi della molecola dopo la morte della cellula con una perdita di ATP pari al 50% dopo 5 minuti e al 65% dopo 20 minuti (Nannipieri *et al.*, 1990).

L'utilizzo di ATP per la stima della biomassa si basa sull'osservazione che questo nucleotide è presente in maniera relativamente costante nelle cellule microbiche con un rapporto C:ATP pari a 250 (Karl, 1980; Oades e Jenkinson, 1979; Jenkinson, 1988).

Per queste caratteristiche la misura di ATP trova impiego anche nella valutazione degli effetti causati dalla presenza di tossici sulla vitalità cellulare (Vanhala *et al.*, 2006).

La misura della concentrazione di ATP viene effettuata sfruttando la tecnica di luminescenza come proposto da Holm-Hansen e Booth (1966). La reazione enzimatica che avviene tra l'ATP ed il complesso enzimatico luciferina-luciferasi, estratto dall'addome di lucciola (*Photinus pyralis*) produce un'emissione di fotoni, la cui intensità decade nel tempo esponenzialmente (Zoppini e Azzaro, 2010). La reazione prodotta può essere così schematizzata:



dove:

E = luciferasi

LH = luciferina

E · LH₂ · AMP = complesso luciferiladenilato

PP = pirofosfato

AMP = adenosin-monofosfato.

La reazione è molto veloce ed il massimo di emissione avviene dopo una latenza di 25 msec. L'emissione luminosa è misurata tramite un luminometro. Dalla comparazione tra le letture del campione e quelle ottenute da soluzioni a concentrazione nota di ATP si risale alla concentrazione di quest'ultimo nel campione in esame.

L'estrazione dell'ATP è stata effettuata secondo il metodo descritto da Karl e La Rock nel 1975 e modificato da Karl e Craven nel 1980.

Si procede alla preparazione di una retta standard a partire da soluzioni di ATP a concentrazioni note comprese tra $1,33 \text{ ng mL}^{-1}$ e $66,6 \text{ ng mL}^{-1}$. Questi standard sono stati preparati diluendo in Tampone Tris (0,02 M) varie aliquote di una soluzione madre di ATP ($11,9 \text{ mg L}^{-1}$) (SIGMA A7699).

Il sedimento da analizzare (1 g) è stato posto in fiale sterili da 15 mL e sono state preparate 3 repliche per ogni misurazione. Parallelamente sono state preparate altrettante fiale contenenti sedimento, utilizzate come bianco e come standard interno. In particolare questi campioni, prima di essere trattati secondo il protocollo, sono stati riscaldati a 100°C per un'ora in modo tale da degradare l'ATP presente nel campione. A tutte le provette sono stati aggiunti 5 mL di H_3PO_4 (1 M). In seguito le fiale sono state agitate con un vortex ad intervalli di 10 secondi per un totale di 60 secondi e il loro contenuto è stato lasciato sedimentare per 10 minuti. A questo punto, è stato aggiunto 1 mL di tampone Tris.

Gli standard sono stati preparati aggiungendo 1 mL di soluzione standard di ATP, al sedimento bollito, a diverse diluizioni. Il sedimento è stato nuovamente agitato con un vortex per altri 10 secondi e poi centrifugato per 5 minuti a 1800 giri. Dopo la centrifugazione, sono stati prelevati 4 mL di surnatante a cui sono stati aggiunti 1 mL di EDTA (48 mM). Il pH dell'estratto è stato portato a 7,8 con una soluzione di NaOH (1 M) e il volume dello stesso è stato portato a 10 mL con tampone Tris. I campioni sono stati congelati a -20°C fino al momento della lettura.

Il complesso enzimatico luciferina-luciferasi (SIGMA FLE - 250) è stato ricostituito aggiungendo 25 mL di acqua ultrapura. Quindi l'enzima è stato lasciato riposare al buio in frigorifero per 12 ore. Sono stati aggiunti 50 mL di una soluzione di MgSO_4 (40 mM) e 50 mL di una soluzione di Arsenato di Sodio (100 mM a pH 7,4). La soluzione così ottenuta è stata filtrata su un filtro in policarbonato (GF/F-Gelman) e lasciata riposare 1 ora al buio a temperatura ambiente prima dell'utilizzo.

La misura della concentrazione di ATP è stata eseguita utilizzando un luminometro a piastre (Victor X3 – PerkinElmer). L'estratto (250 μL) è stato trasferito all'interno dei

pozzetti. Tramite un iniettore si sono aggiunti 50 µL del complesso enzimatico all'estratto e registrata immediatamente l'emissione luminosa prodotta.

La concentrazione di ATP è stata calcolata seguendo la seguente equazione:

$$\text{ATP } (\mu\text{g ATP / g}) = ((\text{Lc-b } 2,5) / a) \cdot 0,15 / \text{ps}$$

Lc-b = lettura media del campione corretta per quella del bianco

2,5 = fattore di diluizione

a = coefficiente angolare della retta di taratura

0,16 = fattore di diluizione

ps = peso secco dell'aliquota di sedimento utilizzata

2.4.4 Stima della produzione procariotica di carbonio (PCP)

La produzione procariotica di carbonio è una misura importante per conoscere la velocità con cui il carbonio in forma disciolta è assimilato dalle cellule procariotiche. Poiché i procarioti sono i principali utilizzatori della sostanza organica disciolta, quantificarne il tasso di assimilazione significa descrivere uno dei processi fondamentali per la circolazione del carbonio.

La produzione di carbonio organico comporta un aumento di biomassa per unità di tempo e di volume ed è funzione sia della concentrazione di biomassa presente (B), normalmente espressa in termini di C per unità di volume (ad esempio µg C L⁻¹), che della velocità di crescita specifica (µ) per unità di tempo (ad esempio h) (Ducklow, 2000). In assenza di mortalità, da parte di predatori o di virus, la biomassa procariotica aumenta in modo esponenziale secondo l'equazione:

$$dB/dt = \mu$$

ove t è il tempo e µ è uguale al coefficiente angolare della retta di regressione di ln(B) verso t. Conoscendo µ è possibile calcolare altri due importanti parametri che descrivono la crescita del popolamento batterico, rappresentati dal tempo di generazione ($g = \ln(2)/\mu$) e dal numero di duplicazioni per giorno (1/g). Nella maggior parte degli ecosistemi naturali però la produzione e la mortalità dei batteri si equivalgono, per cui (dB/dt)=0 (Kirchman, 2001).

Per le sue caratteristiche specifiche il metodo che verrà descritto misura la produzione che si realizzerebbe in una situazione di mortalità uguale a zero, dal momento che si basa su incubazioni di durata molto inferiore (1 ora) rispetto alla scala temporale entro cui si verifica sia la crescita che la morte delle cellule batteriche (uno o più giorni).

Dal punto di vista metodologico la produzione procariotica può essere stimata misurando la velocità di incorporazione di vari precursori che vengono utilizzati per la sintesi delle macromolecole. Le due molecole più comunemente utilizzate a tale scopo sono le forme radioattive della timidina (^3H -timidina), precursore del DNA, e della leucina (^3H -leucina), costituente delle proteine. Le due molecole, nelle condizioni sperimentali descritte, vengono utilizzate unicamente dai procarioti.

Le due tecniche, entrambe ampiamente diffuse, differiscono oltreché per lo specifico meccanismo fisiologico coinvolto, per la presenza di interferenze e per l'affidabilità dei coefficienti di trasformazione necessari per convertire la velocità di incorporazione del precursore marcato in numero di cellule prodotte o in biomassa, espressa in termini di carbonio (Bell, 1993; Kirchman, 1993). In estrema sintesi, la misura del tasso di incorporazione della timidina è più adatta per stimare la velocità di crescita procariotica, intesa come produzione di nuove cellule, mentre la misura del tasso di incorporazione di leucina fornisce una stima diretta della velocità di produzione di nuova biomassa intracellulare. In realtà, nelle comunità naturali, in condizioni di crescita bilanciata, le due attività sono accoppiate e le cellule non possono aumentare la loro biomassa senza dividersi, considerando intervalli temporali superiori al tempo di generazione (qualche giorno). Perciò, l'utilizzo contemporaneo delle due tecniche in osservazioni di campo non è normalmente di grande utilità a meno che non si ipotizzi una situazione in cui la crescita batterica sia sbilanciata. In tal caso la differenza tra le due misure potrebbe fornire un'informazione supplementare. Ma una diversa risposta tra i due metodi può anche derivare dall'applicazione di coefficienti di conversione non appropriati o da alterazioni nelle condizioni che influenzano la validità dei coefficienti stessi (Ducklow, 2000).

Da un punto di vista operativo, la tecnica basata sull'incorporazione della ^3H -leucina offre comunque maggiori vantaggi, per i seguenti motivi: a) l'estrazione viene effettuata a temperatura ambiente; b) il rapporto tra la quantità di leucina e di timidina incorporate, a parità di biomassa prodotta, è circa 10 volte maggiore nel caso della leucina, pertanto la tecnica che utilizza questo precursore è più sensibile; c) il coefficiente teorico di trasformazione di leucina in carbonio è più affidabile. Per questi motivi negli ultimi anni la

tecnica basata sull'incorporazione di leucina è stata utilizzata con maggior frequenza (Kirchman, 2001).

Il sedimento (0,5 g) è stato posto all'interno di microprovette in cui è stata aggiunta dell'acqua bi distillata per ottenere un volume finale di 1 mL. Un numero sufficiente di provette è stato preparato per i campioni ed i bianchi. Quest'ultimi sono stati fissati con 50 μ L di TCA 100% (concentrazione finale 5%). In tutte le microprovette, è stata aggiunta una soluzione di leucina (50 μ M concentrazione finale) in parte radioattiva (3 H-Leucina, 0,15 μ M) e per il resto non radioattiva (49,85 μ M) (Buesing e Gessner, 2003). Le microprovette sono state agitate in un vortex e incubate al buio per 60 minuti a 20°C. Successivamente ai campioni non fissati in precedenza sono stati aggiunti 50 μ L di TCA 100% per interrompere l'assimilazione e far precipitare le proteine, e agitati con un vortex. Dopo circa 20-30 minuti si è proceduto all'estrazione delle proteine con una prima centrifugazione delle microprovette a (14000 rcf per 10 minuti a 4°C) e l'eliminazione del surnatante. In seguito, il campione è sottoposto a quattro fasi di lavaggio con l'aggiunta rispettivamente di un'aliquota di 1 mL di TCA 5%, Leucina non radioattiva (40 mM), etanolo 80%, acqua bi distillata intervallate da fasi di centrifugazione ed eliminazione del surnatante. Scartato il surnatante, è stato aggiunto 1 mL di NaOH 1 N al precipitato e scaldato tutto a 90°C per 1 ora. Al termine le microprovette sono state raffreddate in un bagno di ghiaccio e centrifugate nuovamente.

Sono stati, infine, prelevati 100 μ L del supernatante ricavato dall'ultima centrifugazione e aggiunti assieme ad 1 mL di cocktail liquido per scintillatore (Ultima Gold, Packard Bioscience). Quindi la radioattività è stata misurata allo scintillatore e le unità in CPM (colpi per minuto) sono state convertite in DPM (disintegrazioni per minuto).

La velocità di incorporazione di [3 H] Leucina è stata così calcolata:

$$\text{pmoli } [^3\text{H}] \text{ Leucina} / \text{h} \cdot \text{g} = \text{DPM} (4,5 \cdot 10^{-13} \cdot \% \text{ ps} / \text{SA} \cdot \text{h} \cdot \text{pu}) \cdot 10^9$$

DPM = misura dell'attività radioattiva del campione corretta con il bianco

$4,5 \cdot 10^{-13}$ = numero di curie (Ci) per DPM

SA = attività specifica della soluzione commerciale di radioattivo, specifica per ogni lotto dal produttore ($\text{Ci} \cdot \text{mmole}^{-1}$)

h = tempo di incubazione (1 ora)

pu = peso umido sedimento

% ps = percentuale peso secco

La conversione delle moli di [³H] Leucina incorporata in produzione procariotica di carbonio (PCP) è stata calcolata come segue:

$$\text{PCP } (\mu\text{g C / h g}) = (\text{pmoli } [^3\text{H}] \text{ Leucina g}^{-1} \text{ h}^{-1} (131,2 / \% \text{Leu}) \text{ ID } 10^{-6}) (\text{C/PR})$$

131,2 = peso molecolare della [³H] Leucina

%Leu = 0,073 - frazione di leucina nelle proteine

ID = 2 - diluizione intracellulare dell'isotopo

C/PR = 0,86 – rapporto tra C cellulare e proteine

2.4.5 Stima dei tassi di respirazione della comunità microbica

Negli ecosistemi acquatici il ciclo del carbonio inizia con l'assimilazione della CO₂ da parte degli organismi autotrofi (fotosintesi). La biomassa così prodotta (anabolismo) viene trasferita alla catena trofica mentre il carbonio organico disciolto rilasciato durante l'attività di fotosintesi, viene assimilato dai batteri. La respirazione è il processo attraverso cui la sostanza organica assimilata viene mineralizzata e trasformata in CO₂ (catabolismo). L'insieme di questi processi viene descritto con il termine “pompa biologica del carbonio” (Volk e Hoffert, 1985).

La respirazione è la funzione chiave attraverso cui tutti gli organismi, eccetto i fermentativi obbligati, ottengono energia attraverso l'ossidazione di una grande varietà di composti organici. La respirazione può essere di origine autotrofa, eterotrofa e basale e quindi alimentata da carbonio di origini diverse. La respirazione autotrofa è correlata in maniera complessa ai processi fotosintetici mentre quella eterotrofa è alimentata dalla sostanza organica prodotta *in situ* (autoctona) o generata da fonti esterne al sistema (apporti alloctoni). La respirazione basale è associata al mantenimento delle funzioni basali della cellula.

Diversi fattori possono influenzare il processo di respirazione (temperatura, disponibilità dei nutrienti, composizione della sostanza organica e struttura delle comunità microbiche) agendo sul tempo necessario per la completa ossidazione della sostanza organica (Cherrier *et al.*, 1999; Del Giorgio e Williams, 2005). La risposta dimostrata nei confronti di tali variazioni rende questo parametro un sensibile indicatore di stress ambientali (Hill *et al.*, 2000).

Solo negli ultimi decenni lo studio della respirazione ha ricevuto una notevole attenzione pertanto ad oggi sono poche le misure sperimentali disponibili e scarsi i protocolli standardizzati.

Il tasso di respirazione delle comunità microbiche può essere stimato attraverso vari approcci: a) con misure del consumo o della produzione di composti di riferimento (ossigeno o anidride carbonica) durante un periodo di incubazione in vitro (ad es: Robinson *et al.*, 1999); b) attraverso la misura di enzimi specifici o di sistemi enzimatici (Packard, 1971); c) con stime derivate dalla biomassa attraverso l'applicazione di tassi metabolici biomassa-specifici (Robinson *et al.*, 2002); d) con l'utilizzo di modelli di analisi inversa (Vezina e Platt, 1988).

Il metodo maggiormente utilizzato nei campioni acquosi è il metodo Winkler basato sulla misura dell'ossigeno disciolto prima e dopo un periodo di incubazione al buio (Zoppini *et al.*, 2010b). Nonostante attraverso quest'ultimo sia stato prodotto più del 90% dei dati disponibili, esso presenta diversi limiti di rilevabilità e di precisione.

In questo lavoro, la respirazione è stata misurata attraverso due metodi.

Nelle indagini *in situ*, si sono utilizzate le camere di incubazione in cui una porzione di sedimento viene incubata insieme all'acqua del fiume per misurare il consumo di ossigeno tramite sonda. Questo metodo è stato utilizzato per lo studio di sedimenti di fiumi temporanei (Jones *et al.*, 1995, Uehlinger *et al.*, 2002, Zoppini *et al.*, 2010).

Negli esperimenti di laboratorio si è invece preferito utilizzare il metodo di misura dell'attività del sistema di trasporto degli elettroni (ETS) (Packard, 1971, Trevors *et al.*, 1982). Questo metodo garantisce una migliore riproducibilità ed una minore manipolazione del campione (Döring, 2007).

2.4.5.1 Descrizione del metodo con camere di incubazione

La respirazione della comunità microbica presente nel sedimento è stata rilevata misurando il consumo di ossigeno in campioni di sedimento chiusi all'interno di camere di incubazione (Fig. 2.8). Questo approccio si basa sulla misura del consumo di ossigeno durante il periodo di incubazione del sedimento.

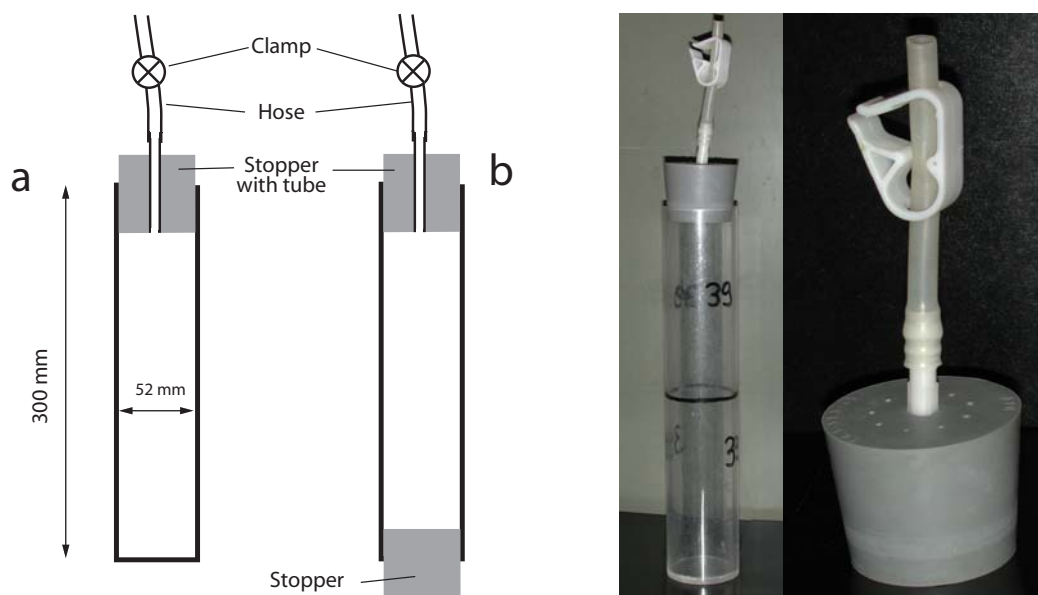


Figura 2.8 - Camere di incubazione del sedimento per la misura della respirazione delle comunità microbiche del sedimento (Uehlinger U.).

Una camera di incubazione è costituita da un tubo di vetro con tappo dalle dimensioni 54 mm x 300 mm. Il sedimento, circa 400 g, è stato introdotto all'interno di 2 tubi, di peso noto e precedentemente lavati in acido cloridrico (0.1 N), andando ad occupare circa la metà dello spazio. Successivamente, è stata aggiunta acqua di fiume, circa 300 mL, satura di ossigeno, prefiltrata su filtri da 0.2 μm (Nuclepore), precedentemente lavati in acido cloridrico (0.1 N). Questa procedura elimina il particolato, inclusi i microrganismi, che potrebbero interferire nelle misure. Le camere sono state lasciate a riposo per alcuni minuti prima di misurare la concentrazione di ossigeno disciolto (iniziale) tramite sonda (WTW oxi 330, sonda cell oxy 325). Successivamente le camere sono state chiuse, pesate e adagiate orizzontalmente in un incubatore al buio alla stessa temperatura misurata *in situ*, per 2 ore. Al termine dell'incubazione le camere sono state aperte per misurare la concentrazione di ossigeno disciolto (finale).

Il tasso di respirazione della comunità microbica è stato calcolato come consumo di ossigeno disciolto nel tempo per unità di peso secco. La velocità di consumo di ossigeno è stata poi convertita in C utilizzando il quoziente di respirazione $RQ=1$.

2.4.5.2 Descrizione del metodo biochimico (ETS)

Il principio di questo metodo si basa sul sistema di trasporto degli elettroni (*Electron Transport System* - ETS) presente nella membrana lipoproteica dei mitocondri degli eucarioti e nella membrana cellulare dei procarioti. L'ETS rappresenta l'ultima fase (dopo

la glicolisi e il ciclo di Krebs) del processo respiratorio dove avviene la completa ossidazione della materia organica e la formazione dell'ATP.

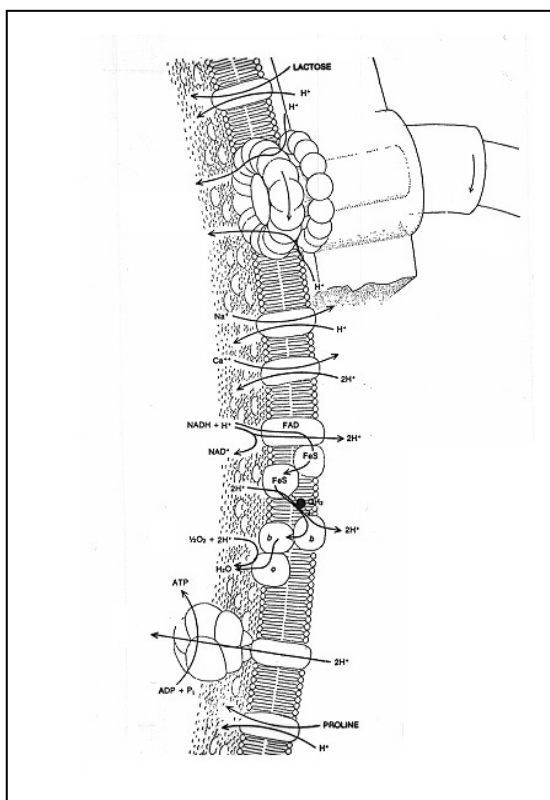


Figura 2.9 - Sezione trasversale della membrana plasmatica di *Escherichia coli*, con diversi sistemi di trasporto (l'apparato flagellare, l'enzima ATPasi ed il sistema di trasporto di elettroni (ETS), che consiste nella sequenza di diversi trasportatori di elettroni (FAD, FeS, H₂(Quinone), citocromi b,b_o) che riducono l'O₂ a H₂O durante la respirazione.

Il metodo di misura utilizza come accettore di elettroni il 2-(p-iodofenil) 3-(p-nitrofenil) -5 fenil tetrazolio cloruro 2 (INT), che compete fortemente con l'ossigeno per l'acquisizione degli elettroni della catena di trasporto. L'accettore finale della catena di trasporto non deve essere necessariamente l'ossigeno. I batteri anaerobi usano lo stesso processo per catalizzare la produzione di ATP ma l'accettore finale è un'altra specie elettronegativa come lo zolfo e l'azoto. Tramite questo metodo è quindi possibile stimare sia la respirazione aerobica che anaerobica (Packard *et al.*, 1971).

La misura si basa sull'ossidazione dell'ubichinone, che precede il complesso di citocromi, e la riduzione dell'INT a INT-Formazano durante un periodo di incubazione ben preciso. Questo tipo di misure rappresentano una buona stima dei tassi di respirazione e sono utilizzate in diversi ambienti acquatici per diverse matrici (Blenkinsoop e Lock, 1990, Relexans 1996; Simčić *et al.*, 2009).

Le prime applicazioni di questo metodo sono state effettuate in ambiente marino nei primi anni '70 (Packard *et al.*, 1971). I protocolli standardizzati per sedimenti fluviali sono invece scarsi (Belain *et al.*, 1988; Songsten-Alpin *et al.*, 1995).

Per misurare l'attività del sistema di trasporto degli elettroni esistono due metodi. Il primo è basato sull'estrazione degli enzimi coinvolti e l'utilizzo di INT con altri substrati

naturali (NADH e NADPH); da questo metodo si ottiene la velocità di respirazione potenziale della comunità microbica. Il secondo, invece, consiste nell'incubare la comunità microbica intatta con una soluzione di INT senza l'aggiunta di altri substrati. Con questo metodo si ottengono tassi di respirazione più vicini a quelli reali (Relexans, 1996). Per queste particolari caratteristiche, il secondo metodo è stato preferito al primo per le indagini relative a questo Progetto sperimentale.

2.4.5.3 Ottimizzazione delle misure del metodo biochimico

Le misure di ETS *in vivo* sono state precedute da una fase di ottimizzazione del metodo utilizzando il sedimento del fiume Celone e il metodo descritto da Trevors (1982), per il suolo, e Blenkinsop e Lock (1990), per il biofilm. Nel periodo precedente l'esperimento sono state effettuati i test per l'ottimizzazione del metodo.

Ottimizzare le condizioni di misura è molto importante per disporre di un tasso di respirazione indipendente da fattori metodologici. In questo metodo in particolare la concentrazione di formazano, ovvero il prodotto della reazione che avviene tra la catena di trasporto degli elettroni e il substrato, pone dei limiti perché risulta tossico per le comunità microbiche. Inoltre l'utilizzo di tempi d'incubazione troppo lunghi possono portare ad una sottostima dell'attività respiratoria per l'esaurimento del substrato stesso.

Le prove preliminari hanno riguardato l'ottimizzazione della concentrazione di substrato (INT) e l'ottimizzazione del tempo d'incubazione utilizzando il sedimento del fiume Celone.

Per la prima prova sono state utilizzate concentrazioni di substrato (INT) simili a quelle utilizzate in bibliografia e comprese tra 0,4 e 2 mg L⁻¹. Quest'ultima concentrazione corrisponde al limite di solubilità del substrato in acqua. L'andamento delle attività di ETS ottenuto alle diverse concentrazioni di substrato sono descritte nella figura 2.10 e sono relativi a 6 ore di incubazione con 0,4 g di sedimento umido. La variazione della formazione di formazano al variare della concentrazione di INT è risultata lineare.

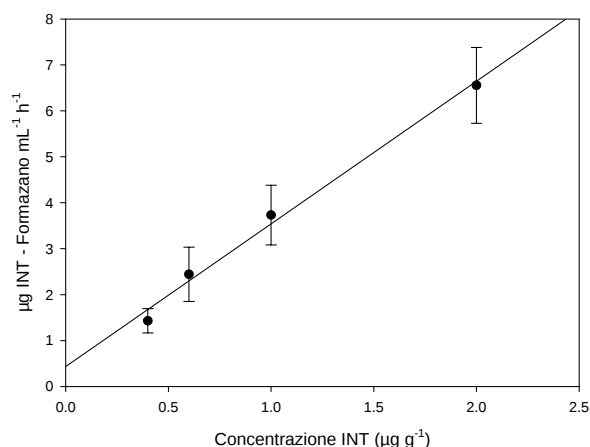


Figura 2.10 - Relazione che lega la variazione della concentrazione di substrato (INT) alla velocità di formazione del prodotto di reazione (INT-Formazano).

In seguito sono stati misurati i valori di ETS a diversi tempi di incubazione utilizzando le due concentrazioni di substrato più elevate tra quelle testate (Fig. 2.11).

Selezionando tempi di incubazione di 8 ore ed una concentrazione di substrato pari a 1 mg g^{-1} ci si pone nelle condizioni prossime alla saturazione senza incorrere nei problemi di solubilità posti dalla concentrazione più elevata. Il metodo si è dimostrato estremamente sensibile anche per la misura dei tassi più ridotti di respirazione.

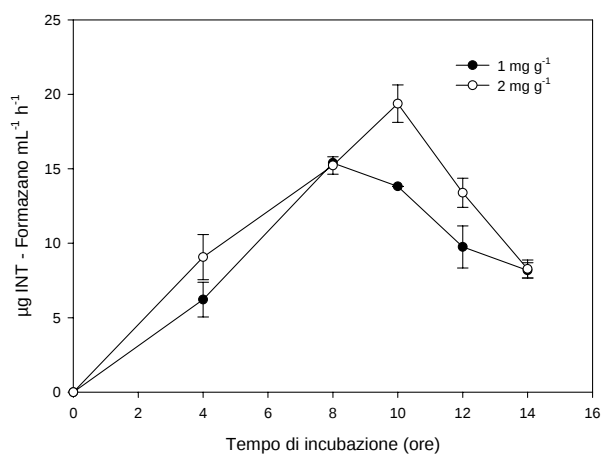


Figura 2.11 - Variazione della velocità di formazione del prodotto di reazione (INT-Formazano) al variare del tempo di incubazione.

Il sedimento da analizzare è stato posto in 3 provette sterili da 15 mL in un quantitativo pari a circa 0,4 g. Sono state preparate provette per i bianchi, per gli standard interni e per i campioni. Le aliquote di sedimento destinate ai bianchi e agli standard interni sono stati posti nella piastra riscaldante per 1 ora a 100°C , raffreddati e infine fissati con 20 μL di

formaldeide (concentrazione finale 2%). Dopo aver aspettato circa 15 minuti per dare modo alla formalina di agire completamente, ai bianchi e ai campioni sono stati aggiunti 100 μL di soluzione INT (conc. finale 1 mg g^{-1} di sedimento) (SIGMA I8377), sono stati agitati con un vortex e incubati al buio a 20°C nella camera termostata per 8 ore. Negli standard interni invece sono state aggiunte varie aliquote di soluzione INT-Formazano (5 mg mL^{-1}) in modo da ottenere delle concentrazioni finali pari a quelle misurate per la curva standard senza sedimento e incubati come descritto sopra. Questa procedura è stata necessaria per verificare il possibile adsorbimento dell'INT-Formazano al sedimento.

Al termine dell'incubazione il Formazano è stato estratto con l'aggiunta di 10 mL di metanolo. Per migliorare l'efficienza di estrazione, i campioni sono stati agitati per un'ora e sonicati per 2 minuti. Al termine dell'estrazione i campioni sono stati centrifugati a 5000 giri per 10 minuti a 4°C). Una soluzione madre di INT-Formazano (6 $\text{mg} / 10 \text{ mL}$) (SIGMA I7375) è stata utilizzata per ottenere soluzioni in metanolo a diversa concentrazione, compresa tra 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, per la preparazione della retta standard (Fig. 2.12). Le soluzioni possono essere conservate in frigo e sono utilizzabili anche dopo alcuni giorni dalla preparazione.

Aliquote di 200 μL dell'estratto sono state distribuite in piastre a 96 pozzetti in 6 repliche per ogni estrazione. Le piastre sono state trasferite nello spettrofotometro (Victor X3 – PerkinElmer) ed i campioni letti ad una lunghezza d'onda pari a 490 nm. Sottraendo le misure dei bianchi a quelle dei campioni ed utilizzando la retta di taratura si è risaliti alla concentrazione di INT-Formazano formatosi durante il tempo di incubazione.

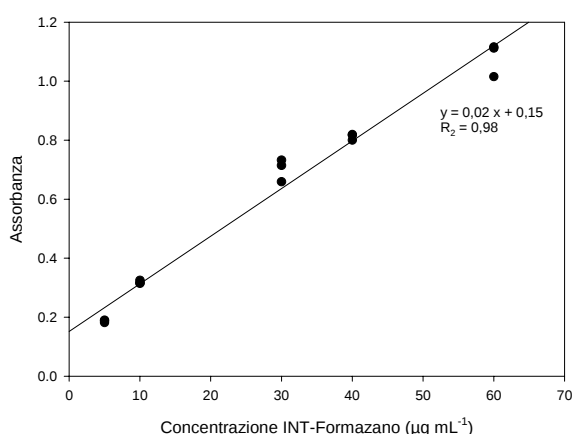


Figura 2.12 - Esempio di curva standard ottenuta da diluizioni dell'INT-Formazano.

Per risalire al consumo di ossigeno è stata utilizzata la seguente formula:

$$\text{Attività ETS } (\mu\text{g O}_2 / \text{h} \cdot \text{g}) = ((Ac - b \cdot 10,1 \cdot 32) / (471,26 \cdot 2 \cdot \text{h} \cdot a)) / (\text{pu} \cdot \% \text{ps})$$

A = assorbanza del campione corretta con il bianco
471,26 = peso molecolare dell'INT-Formazano
32 = peso molecolare dell'ossigeno molecolare
2 = fattore di conversione (2 moli di INT-F sono uguali a 1 mole di O₂)
h = ore di incubazione
a = coefficiente angolare della retta di taratura
10,1 = volume finale (10 mL di metanolo + 0,1 mL di substrato)
pu = peso umido del sedimento
ps = percentuale del peso secco dell'aliquota di sedimento utilizzata

Per la conversione dei valori attività di ETS in $\mu\text{moli di C}$ è stato utilizzato un quoziente di respirazione $RQ = 1$ (rapporto molare tra la CO₂ prodotta e l'O₂ respirato).

2.4.6 Attività enzimatiche extracellulari

L'attività di mineralizzazione della materia organica polimerica avviene per passi successivi ed è in grado di modificare il funzionamento dei cicli biogeochimici (Azam *et al.*, 1993). Negli ecosistemi acquatici la degradazione delle molecole organiche polimeriche (es. proteine, lipidi, polisaccaridi, fosfati organici) viene principalmente espletata da enzimi extracellulari perché i batteri eterotrofi, per via di limiti strutturali della parete cellulare, possono assimilare direttamente solo molecole con peso molecolare minore di 600 Dalton (es: aminoacidi, zuccheri semplici, acidi grassi) (Hoppe, 1991). L'assimilazione di molecole organiche ad elevato peso molecolare è possibile quindi solo attraverso la loro idrolisi operata da enzimi posti esternamente alla cellula (Hoppe *et al.*, 2002, Zoppini *et al.*, 2005).

Il processo di idrolisi enzimatica contribuisce al riciclo di nutrienti, utili ai processi di produzione primaria e produzione procariotica eterotrofa, quali carbonio, azoto e fosforo (Azam *et al.*, 1983; Azam *et al.*, 1993; Del Giorgio e Cole, 2000) ed in grado di controllare la crescita microbica. La determinazione dei tassi di idrolisi su classi specifiche di composti organici è utile per descrivere il contributo dell'attività microbica al turnover dei costituenti della sostanza organica disponibile.

Numerosi microrganismi, tra cui batteri eterotrofi, microalghe, cianobatteri, funghi e lieviti, sintetizzano enzimi extracellulari. Questi si distinguono in: a) ectoenzimi, legati alla parete cellulare o contenuti nello spazio periplasmico della cellula produttrice; b) enzimi

extracellulari, o esoenzimi, associati alla parete cellulare. Gli ectoenzimi rendono disponibili i composti a basso peso molecolare nelle immediate vicinanze della cellula, permettendole di competere con altri organismi per l'acquisizione di nutrienti. Gli esoenzimi sono presenti anche in fase disciolta nel mezzo acquoso, rilasciati dalle cellule o adsorbiti a particelle diverse dalla cellula che li ha prodotti (Chrost, 1990).

I meccanismi di regolazione dei processi di sintesi consentono di distinguere fra enzimi costitutivi, sintetizzati indipendentemente dalla presenza del substrato specifico, ed enzimi inducibili, la cui sintesi dipende dalla concentrazione di substrato disponibile. Infatti una condizione di limitazione da nutrienti può indurre le cellule batteriche alla sintesi di enzimi per l'acquisizione dell'elemento limitante (Hoppe, 1983).

Anche se i meccanismi di decomposizione di composti specifici possono essere studiati in esperimenti *in vitro*, negli studi di ecologia risultano utili quelle indagini che danno informazioni sull'attività *in situ*. Tutto ciò ha portato allo sviluppo di metodi biochimici per la determinazione delle attività enzimatiche extracellulari su classi specifiche di composti organici polimerici. Questi metodi utilizzano substrati modello i cui prodotti di idrolisi sono molecole fluorescenti (Hoppe, 1993).

I substrati artificiali fluorogenici che simulano classi di composti organici naturali, specifici per ogni enzima, sono elencati nella tabella 2.1.

Substrato	Enzima Extracellulare	Applicazione
MUF-N-acetil-glucosaminide	N-acetil-glucosaminidasi (chitinasi)	Acque salmastre
L-Leucil- β -naftilamide	Aminopeptidasi	Acque naturali
L-Leucina-4-metilcumarina-7-amido (Leu-MCA)	Aminopeptidasi	Laghi, sedimenti marini, acque salmastre
MUF- β -D-galattopiranoside	B-D-galattosidasi	Acque naturali
MUF- α -D-glucopiranoside	α -D-glucosidasi	Acque salmastre e eutrofiche
MUF- β -D-glucopiranoside	β -D-glucosidasi	Acque salmastre, naturali, eutrofiche
MUF- β -D-glucuronide	β -D-glucuronidasi	Test dei coliformi fecali
MUF-butarato-eptanoato-palmitato	Lipasi	Acque salmastre
MUF-fosfatasi	Fosfatasi	Laghi
MUF-solfato	Solfatasi	Fiumi

Tabella 2.1 – Elenco dei substrati fluorogenici usati in letteratura per lo studio dell'attività enzimatica extracellulare in ambienti acquatici. Attività specie-specifiche sono utilizzate come indicatori di inquinamento fecale (modificato da Hoppe, 1993).

Questi substrati contengono una molecola fluorescente (“gruppo fluoroforo” o “fluorocromo”) e una o più molecole naturali (es: glucosio, aminoacidi) legate da legami specifici (es: peptidico, estere). La fluorescenza viene osservata solamente quando il gruppo fluoroforo viene rilasciato dall'attività idrolitica degli enzimi naturali. L'idrolisi dei

substrati è inibita competitivamente da una grande varietà di composti naturali con le stesse caratteristiche strutturali.

I substrati artificiali contengono, come gruppo fluoroforo, il metilumbelliferone (MUF) o il 7-amino-4-metilcumarina (AMC) che non sono tossici per i microrganismi (Fig. 2.13).

La reazione di idrolisi enzimatica dipende da tre principali fattori: 1) il pH, poiché i substrati derivati dal MUF emettono una maggiore intensità di fluorescenza a pH alcalino pertanto nei casi in cui l'attività è ridotta si eleva il pH del campione; 2) il tempo e la temperatura di incubazione; 3) la concentrazione del substrato e la presenza di inibitori.

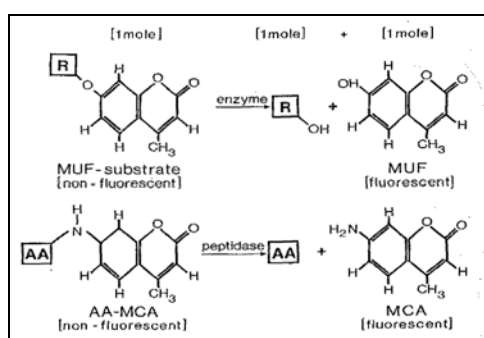


Figura 2.13 – Struttura molecolare dei substrati marcati con il 4-metilumbelliferil (MUF), di quelli marcati con la 4-metilcumarinil-7-amido (MCA) e dei prodotti della loro idrolisi enzimatica.

Prima dell'esecuzione delle analisi è indispensabile conoscere la concentrazione di saturazione degli enzimi di cui si vuole misurare l'attività e la linearità nel tempo della reazione. A questo scopo sono stati preparati dei test in cui si è misurata la risposta dell'enzima a concentrazioni crescenti di substrato e al tempo di incubazione (Fig. 2.14).

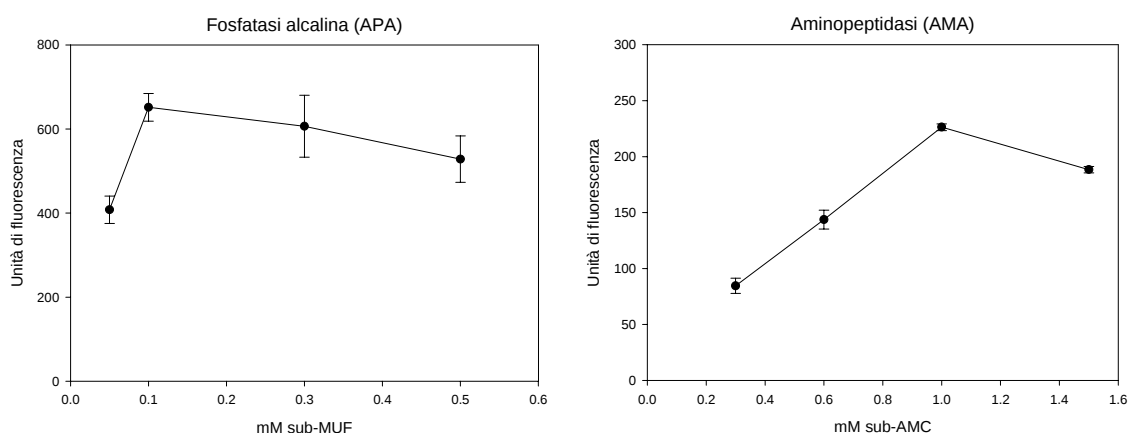


Figura 2.14 - Esempi di curve di saturazione ottenute per i substrati contenenti MUF ed MCA, utilizzati rispettivamente per l'analisi delle attività enzimatiche extracellulari fosfatasi alcalina e aminopeptidasi.

In seguito a questi test si sono utilizzate le seguenti concentrazioni nel mezzo di incubazione: leucina-4-AMC; 1mM, 4-MUF-P-fosfato, 0,3 mM; MUF-beta-D-glucopiranoside, 0,5mM; 4-MUF-oleato, 0,5mM. I tempi di incubazione adottati sono stati inizialmente selezionati tramite test preliminari e sono stati di 1h per tutte le attività tranne che per la aminopeptidasi (1.5 ore).

Sono stati posti 200 mg di sedimento in 3 provette per i campioni e altrettante per i bianchi e gli standard interni (Wobus *et al.*, 2003). Nelle provette per i campioni e i bianchi sono stati aggiunti 60 μ L di acqua bidistillata e le provette destinate ai bianchi sono state messe a denaturare su una piastra riscaldante per 1 ora. Al termine sono stati aggiunti 30 μ L di substrato sia ai bianchi che ai campioni e le provette sono state incubate al buio alla stessa temperatura osservata *in situ* (o 20°C nei test di laboratorio). La durata dell'incubazione varia in base alla natura del campione e nel nostro caso è previsto un tempo di 60 minuti per i substrati derivati dal MUF e 90 minuti per quelli derivati dall'AMC. Subito dopo l'incubazione è stato aggiunto 1 mL delle rispettive soluzioni tampone per bloccare la reazione di idrolisi enzimatica e le provette sono state centrifugate per 10 minuti a 6°C a 7000 giri/minuto.

Al termine della centrifugazione sono stati prelevati 200 μ L di surnatante, posti in una piastra a pozzetti e misurata l'emissione di fluorescenza allo spettrofluorimetro (Victor X3 – PerkinElmer). Per misurare la fluorescenza sono state utilizzate una lunghezza d'onda di eccitazione (365 nm per il MUF e 380 nm per l'AMC) e una di emissione (446 nm per il MUF e 440 per l'AMC). L'intensità di fluorescenza emessa dal campione è stata convertita in concentrazione di AMC o MUF rilasciato tramite l'utilizzo della retta di taratura. Le soluzioni madre di AMC e MUF per la costruzione delle rette standard sono preparate dissolvendo le rispettive sostanze (MUF-4-Metilumbelliferone e AMC-7-Amino4metilcumarina) in metilcellosolve. Le soluzioni così preparate possono essere conservate in provette sterili, al buio a -20°C, senza subire alterazioni. Appena prima del saggio, le soluzioni vengono diluite in un tampone (glicina 0,1 M per MUF e HEPES 0,1 M per AMC) per ottenere soluzioni di lavoro con concentrazione pari a 200 μ mol/L e dalle quali, in seguito verranno ricavate altre diluizioni per l'ottenimento della retta.

L'attività enzimatica extracellulare (EEA) è calcolata secondo la formula:

$$EEA (\mu\text{mol MUF o AMC} / \text{h} \cdot \text{g}) = ((F_{c-b} - F_0) / (\text{h} \cdot C)) / (\text{pu} \cdot \% \text{ ps})$$

V = velocità di idrolisi

F_{c-b} = fluorescenza emessa dal campione sottratta di quella emessa dal bianco

h = tempo di incubazione (ore)
 a = coefficiente angolare della retta di taratura
 pu = peso umido dell'aliquota di sedimento
 $\% ps$ = percentuale del peso secco

Dai tassi di produzione di MUF o MCA si può stimare il flusso di C e P liberati dall'attività di idrolisi attribuendo ad ogni umole di fluorocromo il rilascio di molecole a 6 atomi di carbonio (es. glucosio o aminoacidi) o di ortofosfato (Hoppe, 1993).

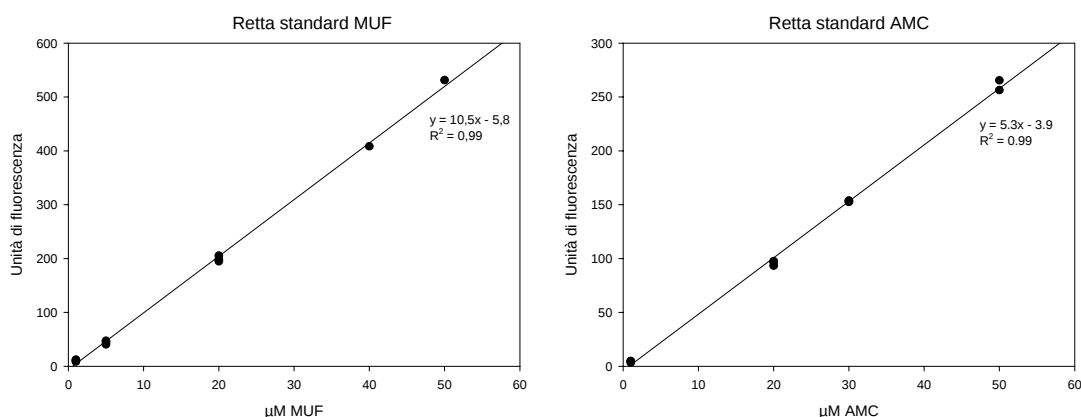


Figura 2.15 – Esempio di rette di taratura utilizzate per il calcolo delle velocità di formazione del MUF (fosfatasi alcalina, lipasi e beta-glucosidasi) e dell'AMC (aminopeptidasi).

2.4.7 Procedura per la marcatura dei siti attivi per l'attività extracellulare della fosfatasi alcalina (ELF)

Nell'esperimento di reidratazione del sedimento campionato durante il periodo di siccità estiva, sono state effettuate misure accurate di fosfatasi, in quanto questa attività enzimatica extracellulare risulta essere la più attiva tra quelle testate in condizioni di siccità. Il metodo prescelto utilizza il substrato fluorescente ELF®97 fosfato (ELFP, Molecular Probe) che permette di visualizzare al microscopio ad epifluorescenza i siti attivi delle cellule nei confronti di questa attività. Tale substrato solubile viene idrolizzato dalla fosfatasi e forma il precipitato ELF-alcool (ELFA). L'ELFA è una molecola planare altamente insolubile che forma un intenso precipitato giallo-verde fluorescente nel sito in cui avviene l'attività enzimatica (Fig. 2.16). Il precipitato alcolico fornisce un segnale fluorescente molto fotostabile, visibile mediante il microscopio ad epifluorescenza ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 365 nm e di emissione 530 nm.

Per l'esperimento è stato utilizzato il sedimento secco prelevato nella stazione 1 (Castelluccio Valmaggiore) nel mese di agosto 2010. Un'aliquota di sedimento (200 mg) è

stata reidratata aggiungendo 1.5 mL di acqua sintetica. Successivamente, il campione è stato agitato, e sono stati prelevati 50 µl di surnatante. Al surnatante è stata aggiunta un'aliquota (1,5 µl) di soluzione ELFP con concentrazione finale 150 µM. Il surnatante è stato posto all'interno di un vetrino a pozzetto ed osservato al microscopio ad epifluorescenza. Il conteggio dei siti attivi per l'attività enzimatica extracellulare di fosfatasi è stata effettuata sullo stesso vetrino in diversi tempi a partire dal momento della idratazione (0, 1.5, 3, 4, 22, 26, e 50 ore).

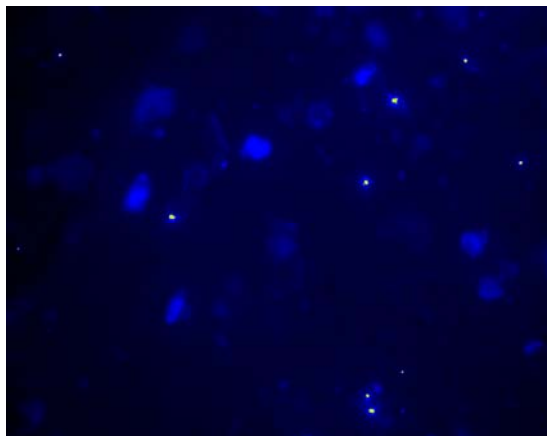


Figura 2.16 - Foto ottenuta al microscopio ad epifluorescenza (100X) di cellule marcate con ELF®97 fosfato, indicatore della presenza di siti attivi per l'attività enzimatica extracellulare di fosfatasi alcalina.

2.5 Allestimento dei microcosmi

2.5.1 Esperimento di reidratazione del sedimento secco

L'obiettivo di questo esperimento è stato quello di descrivere le dinamiche dei parametri strutturali e funzionali delle comunità microbiche del sedimento del fiume Celone nel momento di passaggio dalla siccità al ritorno dell'acqua. Il sedimento secco è stato campionato nel mese di agosto 2010, presso la località di Castelluccio Valmaggiore sul fiume Celone (stazione 1) e trasportato in laboratorio. Al momento del campionamento il letto del fiume era secco da alcune settimane.

Il sedimento è stato caratterizzato per il contenuto di carbonio organico totale (TOC) e azoto totale (TN) e per i parametri strutturali e funzionali della comunità microbica.

Il sedimento, previo setacciamento (0,2 mm), è stato distribuito nei microcosmi (in triplicato) (Fig. 2.17) contenenti 30 g di sedimento re-idratato con 9.6 mL di acqua ricostituita in laboratorio (Marxsen *et al.*, 2010) priva di carbonio (tabella 2.2). I microcosmi sono stati incubati al buio alla temperatura di 20°C per 14 giorni. La comunità batterica è stata analizzata per l'abbondanza batterica, numero di spore, concentrazione di ATP, produzione procariotica di carbonio (PCP), respirazione (ETS), e attività enzimatiche

(AMA, APA) a diversi tempi dalla reidratazione entro le 24 ore (0, 6, 12, 18, 24 ore) e ogni 48 ore per un periodo di due settimane.



Figura 2.17 - Foto di microcosmi utilizzati negli esperimenti con sedimenti fluviali.

2.5.2 Esperimento di degradazione dei PAH

Quest'esperimento ha avuto come obiettivo quello di descrivere, in condizioni controllate, le interazioni tra una miscela di microinquinanti (PAH, idrocarburi policiclici aromatici) e la comunità microbica presente nel sedimento naturale di un fiume temporaneo.

Il sedimento superficiale è stato raccolto il 25 maggio 2010 presso la località di Castelluccio Valmaggiore sul fiume Celone (stazione 1). Questa stazione è stata selezionata perché il fiume Celone, in questo tratto, conserva le caratteristiche naturali essendo l'impatto antropico ridotto. Il sedimento setacciato (< 2 mm) è stato trasferito in recipienti in polycarbonato lavati in acidi (HCl, 1 N) e trasportato in laboratorio al buio in un contenitore termico.

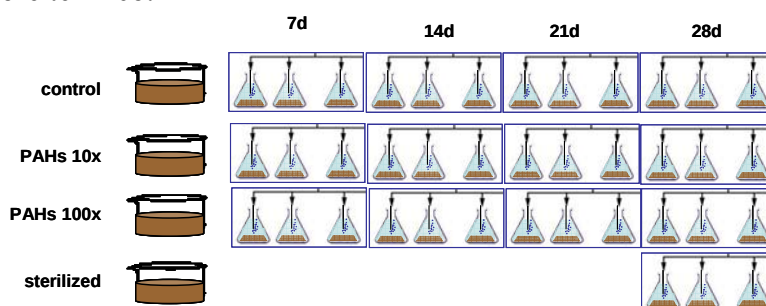


Figura 2.18 - Schema dell'esperimento per lo studio dell'effetto degli idrocarburi policiclici aromatici (PAH) sulle comunità microbiche del sedimento.

Immediatamente dopo la caratterizzazione, il sedimento è stato suddiviso in quattro aliquote: un controllo costituito dal sedimento tal quale in cui la concentrazione di PAH è

stata caratterizzata prima di iniziare le prove, un trattamento arricchito con una miscela di PAH a concentrazione 10 volte maggiore rispetto al controllo (10X), un trattamento arricchito con una miscela di PAH a concentrazione 100 volte maggiore rispetto al controllo (100X) e un trattamento costituito dal sedimento naturale sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti (Sterile). La miscela di PAH è composta dagli stessi composti riscontrati nel sedimento naturale ovvero: fenantrene, fluorantene, benzo(β)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(α)pirene, benzo(g,h,i)perilene e indeno(1,2,3-c,d)pirene, aggiunti negli stessi rapporti relativi.

Dopo 24 ore di acclimatazione a 20°C, il sedimento di ciascun trattamento è stato sottoposto nuovamente ad analisi di laboratorio e utilizzato per l’allestimento dei microcosmi (Fig. 2.18) costituiti da beute da 250 mL nelle quali sono stati distribuiti 100 g di sedimento assieme a 200 mL di acqua ricostituita in laboratorio e priva di carbonio (Verrhiest, 2002) (tabella 2.2).

Sali (mg L ⁻¹)						Parametri		
NaHCO ₃	CaSO ₄ 2 H ₂ O	MgSO ₄ 7H ₂ O	KCl	NaH ₂ PO ₄	KNO ₃	pH	Durezza	Alcalinità
192	120	245,61	8	1,92	15,47	7,6-8,0	160-180	110-120

Tabella 2.2 - Contenuto di sali e parametri chimico-fisici dell’acqua ricostituita in laboratorio.

Le beute che sono state incubate al buio ad una temperatura di 20°C e insufflate con aria per evitare stati di anossia.

I campioni sterili, allestiti per verificare modificazioni di tipo abiotico degli inquinanti, sono stati campionati all’inizio della prova (t1) e alla fine dopo 28 giorni (t28).

Il sedimento contenuto nelle beute è stato analizzato con frequenza settimanale sacrificando di volta in volta tre beute per ogni trattamento. Ad ogni prelievo sono stati misurati l’ossigeno disciolto, il pH e la conducibilità per verificare eventuali variazioni delle proprietà chimico fisiche del mezzo acquoso. La concentrazione dei PAH è stata misurata ad ogni prelievo e la comunità batterica è stata misurata in termini di abbondanza batterica, biomassa totale vivente (ATP), produzione batterica di carbonio (PCP), respirazione (ETS), attività di enzimi extracellulari (AMA, APA).

2.6 Analisi statistica

Per l’analisi statistica è stato utilizzato il programma Sigma-Stat del pacchetto OFFICE (Microsoft) per l’applicazione dei test-*t* e dei test ANOVA.

3. RISULTATI

3.1 Caratterizzazione del sito di studio

L'analisi dei parametri fisico-chimici dell'acqua ha evidenziato un graduale aumento della concentrazione dei solidi sospesi e della conducibilità e dei nutrienti da monte (stazioni 1 e 2) a valle (stazione 3) (tabella 3). Tali risultati rilevano un deterioramento della qualità dell'acqua procedendo verso valle, confermata da indagini precedenti che hanno definito “scadente” l'acqua del fiume Candelaro e “sufficiente” quella del fiume Celone (Armanini *et al.*, 2008). L'evento di piena registrato a luglio subito prima del campionamento, induce un incremento significativo dei valori dei solidi sospesi così come un incremento dei nutrienti. In queste condizioni si registra anche un decremento dei valori di ossigeno disciolto che scendono in tutte le stazioni al di sotto di 1 mg L^{-1} .

L'analisi granulometrica dei sedimenti è stata effettuata durante la campagna di prelievi svolta in Ottobre. Nella tabella 3.2 sono riportati i risultati ottenuti dal setacciamento sequenziale. In tutti i siti di campionamento la frazione che costituisce oltre il 50% del sedimento è riconducibile a quella molto fine del limo ($< 0,063\text{ mm}$).

L'analisi del contenuto di materiale organico totale (TOC), ha mostrato come il picco di piena (luglio 2009) abbia determinato i contributi più elevati tra quelli osservati in questa indagine ($1,8\text{-}2,1\%$) (tabella 3). Nello stesso campionamento si osservano i contributi più elevati di AFDW ($10,3 \pm 1,0\%$) nella stazione di chiusura (3). Un valore significativamente ridotto di AFDW ($1,7 \pm 0,009\%$) si osserva per i sedimenti secchi prelevati nell'Agosto 2010.

La differenza tra il peso secco ed il peso delle ceneri (AFDW) è stato definito come materiale organico particolato (POM), mentre la quantità di carbonio misurata mediante l'analisi CHN è stata definita come carbonio organico particolato (POC) (Fisher *et al.*, 2002). Nella presente indagine si osserva come le condizioni idrologiche determinino ampie variazioni del rapporto POC/POM con valori medi elevati 0,51 e 0,40 nelle stazioni 1 e 2 rispettivamente, in condizioni estive di flusso (luglio) e valori più ridotti, 0,13 e 0,14 rispettivamente, in condizioni autunnali di flusso ridotto (ottobre). Valori pressoché costanti sono stati invece osservati nella stazione di chiusura (0,17 e 0,09 in luglio e ottobre rispettivamente) dove probabilmente la variazione di portata è meno variabile.

Campionamento	Stazione	SS g L ⁻¹	pH	Cond, mS cm ⁻¹	T °C	DO mg L ⁻¹	N _{tot}	N-NH ₄	N _{org} mg L ⁻¹	P _{tot}	P-PO ₄	P _{org}	TOC	TN %	AFDW
		Acqua											Sedimento		
Luglio 2009	1	0,02	8,5	475	24	0,3	3	0,12	2,13	0,17	0,12	0,05	2,1 ± 0,5	0,1 ± 0,01	4,1 ± 0,5
	2	0,04	7,6	614	23	0,4	47	0,07	40,91	0,5	0,44	0,06	1,8 ± 0,02	0,1 ± 0,01	4,4 ± 0,6
	3	4,85	5,1	712	23	0,6	64	0,26	56,27	1,5	1,03	0,46	1,8 ± 0,05	0,3 ± 0,03	10,3 ± 1,0
Ottobre 2009	1	0,01	8,1	524	18	11,0	15,1	0,14	2	0,6	0,55	0,06	0,6 ± 0,28	0,2 ± 0,02	4,5 ± 0,1
	1 umido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0 ± 0,01	0,2 ± 0,004	6,9 ± 0,5
	1 secco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4 ± 0,03	0,1 ± 0,01	3,2 ± 0,3
	2	0,05	7,8	624	17	10,2	10,6	0,13	3,97	1,05	1	0,05	0,9 ± 0,01	0,2 ± 0,01	8,0 ± 0,6
	3	0,08	7,5	1205	20	5,1	10,5	3,65	3,2	1,3	1,05	0,22	0,4 ± 0,003	0,1 ± 0,004	4,4 ± 0,3
Agosto 2010	1 secco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3 ± 0,05	0,2 ± 0,01	1,7 ± 0,009

Tabella 3 - Parametri chimico-fisici di acqua e sedimento (sommerso; umido; secco) dei siti campionati. Solidi sospesi=SS; DO=ossigeno disciolto; total organic carbon=TOC, total nitrogen=TN; ash free dry weight =AFDW. (Valori medi ± deviazioni standard di 3 repliche)

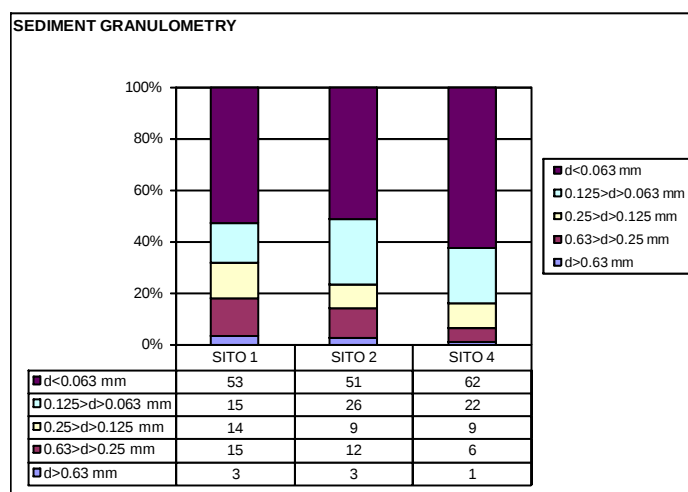


Tabella 3.1 - Analisi granulometrica dei sedimenti campionati nei diversi siti in Ottobre 2009.

3.1.2 Concentrazione di microinquinanti nei sedimenti

Il sedimento è stato caratterizzato per la concentrazione di sostanze pericolose e prioritarie selezionate tra quelle indicate nella Direttiva Europea *Environmental Quality Standards* (2008/105/EC). La lista delle sostanze analizzate include idrocarburi policiclici aromatici (PAH) e alchilfenolo (NP), indicati come potenzialmente pericolosi per la salute umana e gli ecosistemi. I sedimenti analizzati hanno mostrato concentrazioni (tabella 3.2) superiori al limite di detenzione con poche eccezioni che riguardano soprattutto l'indeno(1,2,3)pyrene. La somma delle concentrazioni dei singoli composti (Σ PAH) indica concentrazioni comprese tra 52,3 e 304,7 ng g⁻¹ per i PAH. I picchi di concentrazione totale (Σ PAH) sono stati misurati nei sedimenti campionati in ottobre (275 e 304 ng g⁻¹). Una drastica diminuzione della concentrazione Σ PAH è stata osservata nel sedimento secco di ottobre (52,3 ng g⁻¹). In tutti i siti di campionamento, il fluorantrene risulta il più abbondante tra gli PAH identificati, con valori di concentrazione compresi tra 24,8 ± 14,7 ng g⁻¹ e 205,1 ± 94,2 ng g⁻¹, riscontrati rispettivamente nel sedimento della stazione 1 sommerso nel mese di luglio ed umido di ottobre. Tra gli alchilfenoli, sono state osservate concentrazioni elevate di nonilfenolo (NP, intervallo di conc. 231-3851,9 ng g⁻¹) seguito dal 4-nonilfenol monoetossilato NPEO1, 33,9-1028,6 ng g⁻¹) e 4-nonilfenol di-etossilato (NPEO2, 88,4-290,4 ng g⁻¹) in tutte le stazioni nel mese di luglio raggiungendo livelli pari a 3851,9 ± 34 ng g⁻¹ (stazione 2). Diversamente, il maggiore contenuto totale di alchilfenoli è stato riscontrato nel sedimento prelevato nel mese di luglio nel stazione 1 (4857,9 ± 226 ng g⁻¹). Le concentrazioni di PAH e NP risultano inferiori nei sedimenti secchi campionati nei mesi di ottobre e agosto. In particolare, nel mese di agosto si osserva

una significativa riduzione della Σ PAH ($8,3 \pm 0,4 \text{ ng g}^{-1}$). In questo campione il contributo maggiore è stato dato dai composti fluorantene (Flu) e benzo(g,h,i)perylene (BgP) (30 e 26% rispettivamente), seguiti da benzo(k)fluorantene (BkP) e benzo(a)pyrene (BaP) (isomeri costituiti da 5 anelli, 12%) e da indeno(1,2,3)pyrene (InP) e benzo(g,h,i)perylene (BgP) (isomeri costituiti da 6 anelli, 7%).

Un'eccezione è stata riscontrata per il NP, la cui concentrazione ($285,9 \pm 45,5 \text{ ng g}^{-1}$) nel sedimento secco ad agosto è paragonabile a quella di sedimenti sommersi. Tutte le sostanze analizzate risultano quindi rilevabili anche se le concentrazioni delle sostanze considerate sono definite “tollerabili” dalle Linee Guida Canadesi, le uniche disponibili per i sedimenti (*Canadian Council of Ministers of the Environment*, 1999).

Campionamento	Stazione	Flu	BbF	BkF	BaP	BgP	InP ng g ⁻¹	ΣPAHs	NP	NPEO1	NPEO2	ΣNPs
Luglio 2009	1	24,8 ± 14,7	18,9 ± 7,6	3,3 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1	3,7 ± 0,3	55,1 ± 10	3538,9 ± 218,4	1028,6 ± 13,1	290,4 ± 21	4857,9 ± 226
	2	130,1 ± 107	42,5 ± 18,2	14,6 ± 10,7	6,6 ± 4,1	10,3 ± 7,6	nd	204,2 ± 171	3851,9 ± 34	396,4 ± 25,8	88,4 ± 2,7	4336,7 ± 62,5
	3	70,7 ± 10	25,1 ± 5,6	9,1 ± 2,9	9,5 ± 4,9	10,3 ± 3,6	5,4 ± 0,3	130,1 ± 22,2	361,1 ± 91,7	685,7 ± 67,7	157,8 ± 26,8	1204,7 ± 132,6
Ottobre 2009	1	151,3 ± 76,8	36,2 ± 23,7	37,9 ± 3,6	8,8 ± 5,0	17,8 ± 11,3	23,6 ± 15,8	275,6 ± 132,6	2020 ± 152	500 ± 279	170 ± 93	2690 ± 1894
	1 umido	205,1 ± 94,2	27,8 ± 21	13,9 ± 11	11,1 ± 0,4	14,4 ± 0,9	8,6 ± 3,5	280,9 ± 131	1979,1 ± 49,8	548,5 ± 13,2	182,8 ± 4,4	2710,4 ± 67,5
	1 secco	34,4 ± 2	3,7 ± 0,3	7,7 ± 4,3	3,6 ± 0,2	2,9 ± 0,7	nd	52,3 ± 6,8	1586,1 ± 119,5	426,1 ± 240	142 ± 80	2154,3 ± 151
	2	40,4 ± 3,4	6,6 ± 2	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,5	2,4 ± 0,1	nd	53,3 ± 4,7	2850 ± 346,8	620 ± 212	190 ± 14	3660 ± 573
	3	160,4 ± 24,6	43,9 ± 6,3	39,2 ± 8,9	8,3 ± 1,6	23,4 ± 3,6	29,4 ± 11,4	304,7 ± 56,4	231,6 ± 3,1	33,9 ± 171,5	113,2 ± 57,2	378,7 ± 231,7
Agosto 2010	1 secco	2,5 ± 0,3	1 ± 0,2	1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2,2 ± 0,5	0,6 ± 0,1	8,3 ± 0,4	285,9 ± 45,5	13,7 ± 9,8	nd	299,6 ± 125

Tabella 3.2 Concentrazioni medie (ng g⁻¹±ds) di microinquinanti (PAH; Fluorantene= Flu, benzo(b)fluorantene=BbF, benzo(k)fluorantene=BkF, benzo(a)pyrene=BaP, benzo(g,h,i)perylene=BgP, indeno(1,2,3)pyrene=InP; NP=nonilfenolo NPE1O= nonilfenolo mono-etossilato, NPE2O= nonilfenolo di-etossilato) misurate nei sedimenti campionati nel bacino idrografico del fiume Candelaro (Puglia) in tre diverse stazioni (1,2,3), in diversi periodi dell'anno ed in diverse condizioni di umidità (sommerso; umido; secco)

3.1.3 Caratteristiche strutturali e funzionali della comunità microbica del sedimento

In relazione ai diversi periodi idrologici, la comunità batterica presente nel sedimento è stata caratterizzata in termini di abbondanza ed attività metaboliche implicate nel flusso di nutrienti (C, N, P).

La misura delle abbondanze cellulari nel sedimento ha mostrato valori medi pari a $1,2 \pm 1,3 \times 10^9$ cellule g^{-1} . In estate (luglio 2009), immediatamente dopo un picco di portata, le abbondanze batteriche hanno mostrato valori più elevati (intervallo $0,73 - 2,68 \times 10^9$ cellule g^{-1}) rispetto alla situazione autunnale con flusso ridotto ($0,17 - 0,81 \times 10^9$ cellule g^{-1}) (Fig. 3). Il confronto tra porzioni di sedimento sommerso ed emerso, effettuato in ottobre, ha mostrato differenze significative delle abbondanze batteriche. Nel sedimento ancora umido le abbondanze erano pari a $1,01 \pm 0,32 \times 10^9$ cellule g^{-1} mentre nel sedimento secco risultavano ridotte di un ordine di grandezza ($0,12 \pm 0,04 \times 10^9$ cellule g^{-1}) (Fig. 3).

In condizioni di completa siccità (agosto 2010), l'abbondanza batterica raggiunge i valori minimi riscontrati in questa indagine ($0,02 \times 10^9$ cellule g^{-1}).

Come osservato per l'abbondanza batterica, la produzione procariotica di carbonio (PCP) risulta più elevata in una situazione successiva al picco di piena (luglio, $0,24 - 0,81 \mu\text{mol C h}^{-1} g^{-1}$) rispetto a quella osservata in condizioni di flusso ridotto (ottobre, $0,08 - 0,42 \mu\text{mol C h}^{-1} g^{-1}$) (ANOVA $p < 0,05$). Nei sedimenti emersi e secchi prelevati ad ottobre la PCP ha mostrato i valori simili e tra i più ridotti di questa indagine ($0,02 \pm 0,04 \mu\text{mol C h}^{-1} g^{-1}$), comparabili solo a quelli di sedimenti secchi campionati in agosto ($0,09 \pm 0,02 \mu\text{mol C h}^{-1} g^{-1}$) (Fig. 3). Al contrario, il sedimento emerso ancora umido di ottobre ha mostrato valori di PCP ($0,28 \pm 0,02 \mu\text{mol C h}^{-1} g^{-1}$) più elevati di quello sommerso.

I valori di respirazione della comunità microbica variano in maniera più ridotta rispetto agli altri parametri (media $4,5 \pm 1,7$). I valori più ridotti sono stati osservati nel mese di ottobre in condizioni di flusso ridotto, nei siti 1 e 3 ($0,08 \pm 0,01$ e $0,06 \pm 0,003 \mu\text{mol C h}^{-1} g^{-1}$ rispettivamente).

Un'elevata variabilità è stata osservata per tutte le attività enzimatiche in relazione alle condizioni idrologiche e stagionali. Le attività più elevate sono espresse nei confronti di substrati fosforilati organici, fosfatasi alcalina (APA), e di quelli di origine proteica (aminopeptidasi, AMA). La stazione di campionamento più a valle (stazione 3) si distingue per i tassi elevati di tutte le attività enzimatiche extracellulari a testimonianza della ricchezza qualitativa e quantitativa dei substrati organici disponibili. Questa tendenza mostra come in questa stazione il P inorganico, liberato dall'APA, e i substrati carboniosi liberati dall'azione della beta-glucosidasi (carboidrati) e dalla lipasi (acidi grassi), circolino

molto velocemente e siano, potenzialmente, in grado di sostenere il metabolismo batterico. L'attività dell'APA risulta variabile tra i siti di campionamento a dimostrazione della variabilità delle condizioni ambientali. Nel mese di luglio, è stato osservato un picco di attività di idrolisi del P organico ($2,69 \pm 0,09 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) nella stazione 3 che differisce notevolmente dai valori riscontrati nelle stazioni più a monte (stazione 1: $0,41 \pm 0,03 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, stazione 2: $0,24 \pm 0,01 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (Fig. 3). La stazione 3 presenta un maggiore tasso di idrolisi del P anche nel mese di ottobre rispetto ai valori osservati per la stesso enzima nei sedimenti a monte ($0,88 \pm 0,07 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (Fig. 3). Non sono state osservate differenze significative tra l'attività di idrolisi del P organico nel sedimento secco rispetto al sedimento sommerso e umido ($p > 0,05$), mentre nel mese di agosto il sedimento secco mostra una riduzione significativa per questa attività ($0,03 \pm 0,04 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (Fig. 3).

L'AMA mostra una scarsa variabilità e valori contenuti in tutti i siti ad eccezione del valore osservato nella stazione 3 ad ottobre ($0,81 \pm 0,05 \mu\text{mol AMC h}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Nel sedimento secco l'AMA mostra valori ridotti nei campioni di sedimento secco sia di ottobre che di agosto ($0,08 \pm 0,002$ e $0,01 \pm 0,002 \mu\text{mol AMC h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ rispettivamente). Nel sedimento campionato a luglio nella stazione 3, sono stati osservati i valori più elevati di idrolisi su materiale di origine polisaccaridica (beta-glucosidasi) e lipidica (lipasi) ($1,10 \pm 0,18$ e $1,15 \pm 0,23 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ rispettivamente). Le attività enzimatiche extracellulari della beta-glucosidasi e lipasi non mostrano variazioni significative tra i valori riscontrati nel sedimento umido e sommerso, mentre valori ridotti sono osservati nel sedimento secco ($0,01 \pm 0,01$ e $0,02 \pm 0,003 \mu\text{mol MUF h}^{-1}$).

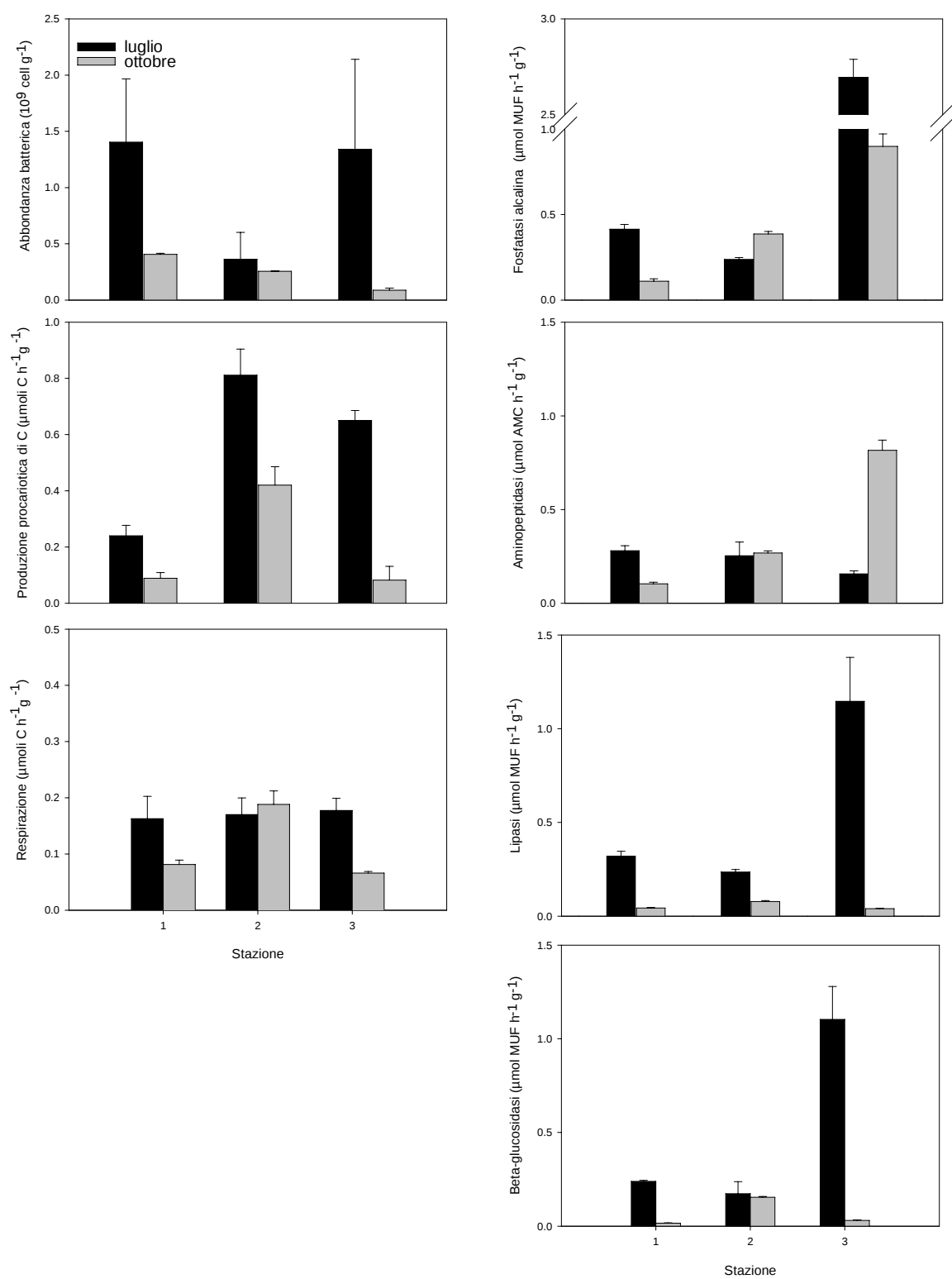


Figura 3 - Valori medi ($\pm$ d.s.) di abbondanza batterica, produzione procariotica di C, tassi di respirazione (a sinistra) e di attività enzimatica extracellulare (a destra) nei siti 1-2-3 nei mesi di luglio e ottobre. I valori sono espressi per grammo di sedimento secco.

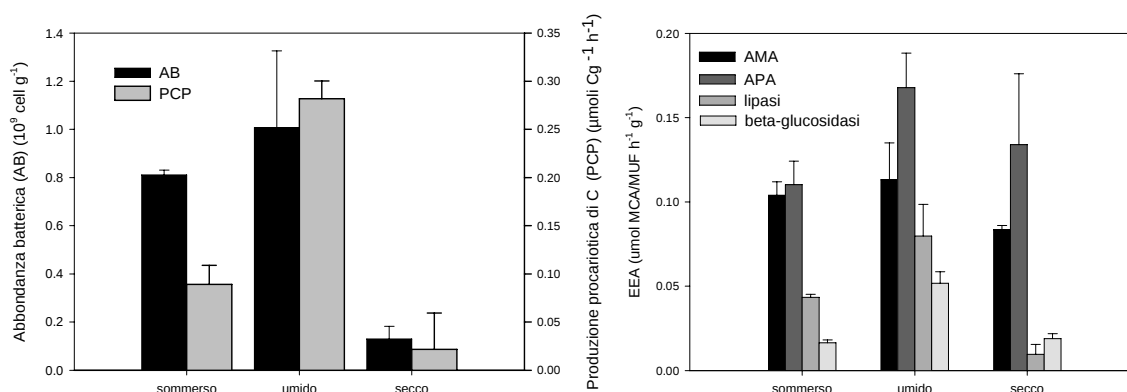


Figura 3.1 - Valori medi ($\pm$ d.s.) di abbondanza batterica e produzione procariotica di C (a sinistra) e di attività enzimatica extracellulare (EEA a destra) nei sedimenti sommersi, umidi e secchi prelevati nel mese di ottobre. I valori sono espressi per grammo di sedimento secco.

3.2 Studio degli effetti dell'alternanza di condizioni idrologiche sulle comunità microbiche del sedimento

Allo scopo di misurare gli effetti di condizioni idrologiche estreme sui processi mediati dalla comunità microbica è stata testata la risposta del sedimento secco, prelevato in un periodo di siccità (agosto 2010) dalla stazione 1 del fiume Celone, alla reidratazione effettuata in laboratorio in condizioni controllate.

Il sedimento mostra inizialmente un valore di abbondanza batterica pari a $1,6 \times 10^7$ cell g^{-1} . Questo valore risulta essere di due ordini di grandezza più basso rispetto al valore medio riscontrato nell'indagine condotta *in situ* (media $3,2 \pm 3,0 \times 10^9$ cell g^{-1}).

Nelle dodici ore successive alla reidratazione del sedimento l'abbondanza batterica aumenta rapidamente fino a raggiungere un valore pari al doppio di quello iniziale ($3,5 \pm 0,23 \times 10^7$ cell g^{-1}) (Fig. 3.2). Successivamente, nessuna variazione dell'abbondanza cellulare viene osservata fino alla fine dell'esperimento.

La concentrazione di adenosintrifosfato (ATP), utilizzato in questo studio come indicatore di biomassa vivente, mostra un incremento iniziale molto rapido raggiungendo nelle prime sei ore una concentrazione di ATP pari a $0,88 \pm 0,19 \mu g g^{-1}$, superiore di dieci volte quella riscontrata nel sedimento iniziale secco ($0,08 \pm 0,15 \mu g g^{-1}$). Un'ulteriore incremento è stato poi osservato al sesto giorno dall'inizio dell'esperimento quando viene raggiunto il valore massimo ($1,88 \pm 0,20 \mu g g^{-1}$).

La produzione batterica (PCP) nel sedimento secco ($0,09 \pm 0,02 \mu mol C g^{-1} h^{-1}$) è simile ai valori minimi misurati *in situ* durante il periodo di scarso flusso (stazione 1, Ottobre). Dopo la reidratazione del sedimento la PCP aumenta nelle prime dodici ore fino

a raggiungere un valore cinque volte più elevato di quello iniziale ($0,48 \pm 0,05 \mu\text{mol C g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Dopo questo rapido incremento si osserva un abbattimento significativo del tasso di produzione che risale solo dopo 10 giorni dall'inizio del trattamento.

La respirazione stimata tramite il metodo dell'electron transport system (ETS), ha mostrato un incremento già a sei ore dall'idratazione del sedimento quadruplicando i valori iniziali misurati nel sedimento secco ($0,011 \pm 0,001$ e $0,43 \pm 9,8 \mu\text{mol C g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Anche i valori della respirazione seguono un andamento sinusoidale, simile a quello già descritto per la PCP. In questo caso però il secondo picco osservato dopo 8 giorni dal momento dell'idratazione, ($0,012 \pm 0,001 \mu\text{mol C g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) supera significativamente il primo.

L'AMA aumenta progressivamente dopo la reidratazione del sedimento con un andamento lineare passando da valori di $0,01 \pm 0,002 \mu\text{mol MCA h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ al valore massimo di $0,03 \pm 0,003 \mu\text{mol MCA h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ dopo otto giorni dalla reidratazione.

L'APA, pur dimostrando valori iniziali elevati ($0,03 \pm 0,04 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{ g}^{-1}$), mostra un incremento significativo di attività solo dopo 18 ore dall'aggiunta dell'acqua nel microcosmo, raggiungendo dopo quattro giorni il massimo di attività ($0,087 \pm 0,004 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{ g}^{-1}$).

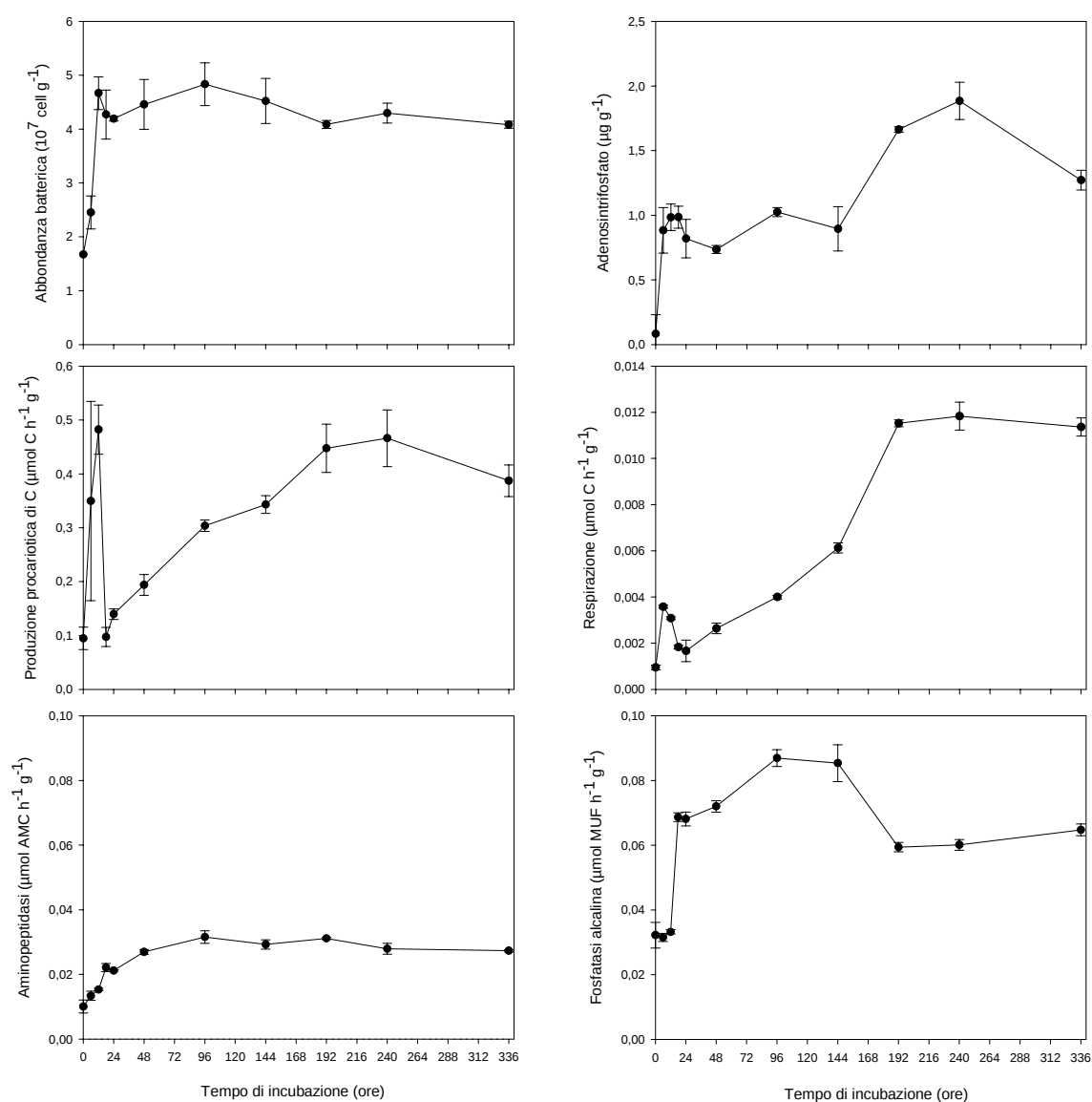


Figura 3.2 - Andamenti delle abbondanze batteriche, della concentrazione di ATP, della produzione procariotica di C, della respirazione della comunità microbica totale, e delle attività della aminopeptidasi e fosfatasi alcalina nel sedimento secco (tempo 0) e nei prelievi effettuati dopo l'aggiunta dell'acqua a diversi intervalli di tempo fino a 14 giorni. I valori sono riportati come medie di tre trattamenti per grammo di sedimento secco, con la relativa deviazione standard.

In un esperimento successivo effettuato utilizzando lo stesso sedimento si è voluto confrontare l'andamento nel tempo delle abbondanze batteriche con quello delle spore, come forma di resistenza alla siccità, misurando la loro abbondanza nei tempi immediatamente successivi a quelli dell'aggiunta dell'acqua. Come si osserva nella rappresentazione riportata nella figura 3.3 le due curve sono speculari. Il tempo per il raggiungimento del picco massimo di cellule batteriche è di 48 ore, tempo che coincide con l'abbattimento del numero delle spore ed il raggiungimento della loro abbondanza minima.

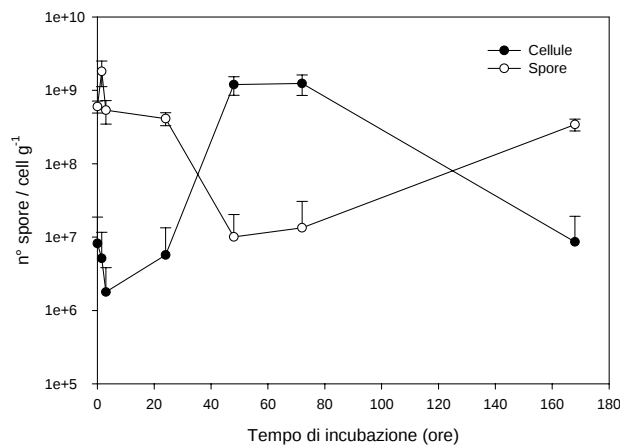


Figura 3.3 - Andamenti nel tempo (ore) delle abbondanze delle cellule batteriche (AB) e del numero di spore in un sedimento del fiume Celone reidratato artificialmente in laboratorio. Sono riportati i valori medi di tre repliche e la deviazione standard.

Nello stesso esperimento si è utilizzato il substrato ELF®97 fosfato per individuare e numerare i siti attivi per la fosfatasi alcalina nel sedimento secco. Inizialmente il numero di siti risultati positivi per l'attività enzimatica extracellulare di fosfatasi alcalina risultano essere numerosi ed in numero superiore ai valori di abbondanza batterica ottenuta con il metodo di numerazione delle cellule totali tramite il fluorocromo DAPI ($1,41 \pm 0,04 \times 10^7$) in questo stesso campione (Fig. 3.4).

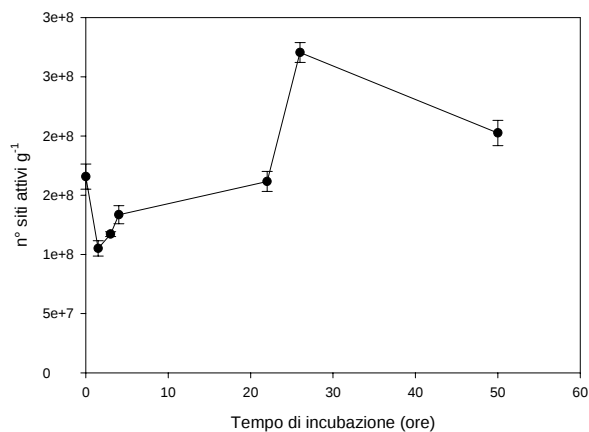
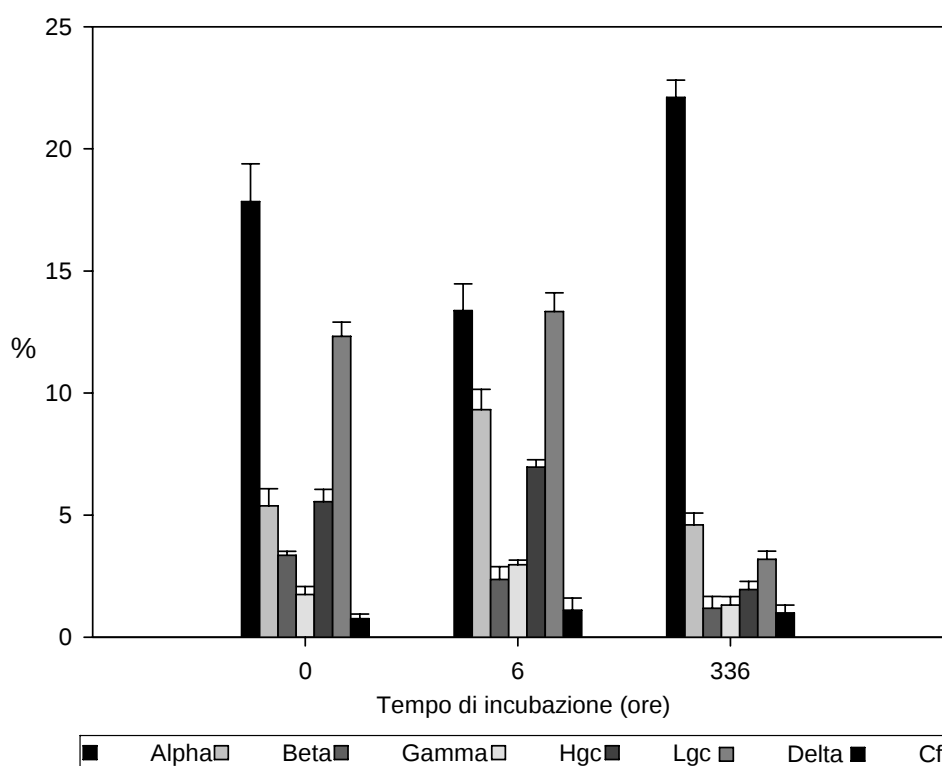


Figura 3.4 - Andamento nel tempo (ore) del numero di siti attivi per la fosfatasi alcalina, marcati con la procedura ELF®97 fosfato.

Questi risultati, ancora preliminari, mostrano come nel sedimento secco le cellule conservino l'attività enzimatica extracellulare di fosfatasi in grado probabilmente di sostenere il metabolismo di mantenimento delle cellule dormienti.

Appendice 1 - Struttura della comunità microbica nelle ore successive alla re-idratazione del sedimento



Nel corso di questa sperimentazione sono state condotte indagini sulla diversità della comunità microbica effettuata con indagini molecolari (metodo CARD-FISH, Fazi *et al.*, 2008).

La composizione della comunità batterica varia moderatamente dopo sei ore di incubazione mostrando la prevalenza degli *Alpha-Proteobacteria* (Alpha) e *Delta-Proteobacteria* (DELTA). Alla fine dell'esperimento, si osserva una diminuzione di tutti i gruppi eccezion fatta per gli *Alpha-Proteobacteria* (alpha).

3.3 Studio dell'interazione tra microinquinanti e le comunità microbiche del sedimento

3.3.1 Variazione della concentrazione dei microinquinanti

Il sedimento del fiume Celone è stato utilizzato per eseguire un esperimento di laboratorio, in condizioni controllate, con l'obiettivo di studiare l'effetto degli idrocarburi policiclici aromatici (PAH) sui parametri strutturali e funzionali della comunità microbica autoctona e la biodisponibilità di questi composti. Il sedimento è stato campionato nel mese di maggio 2010 nella stazione 1 (Fig. 2.1), trasportato in laboratorio ed analizzato entro le 24 ore dal prelievo.

Il campione è stato caratterizzato per la presenza di 7 diversi composti policiclici aromatici (fenantrene, fluorantene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(a)pirene, benzo(g,h,i)pirene, indeno(1,2,3,c,d)pirene) e per i parametri strutturali e funzionali della comunità microbica.

Una miscela costituita dai 7 composti riscontrati nel sedimento naturale (controllo), è stata aggiunta a diverse aliquote di sedimento a concentrazioni 10 (10X) e 100 (100X) volte superiori rispetto al controllo. Le variazioni della concentrazione dei composti organici aggiunti al sedimento è stata monitorata ogni settimana durante i 28 giorni di incubazione. I valori riportati in tabella 3.7 rappresentano le medie delle concentrazioni, misurate al tempo iniziale e dopo 28 giorni, in 3 diversi microcosmi utilizzati per ogni trattamento.

<i>Trattamento</i>	<i>Controllo</i>		<i>PAH 10X</i>		<i>PAH 100X</i>	
<i>Tempo (giorni)</i>	1	28	1	28	1	28
Fenantrene	4,8 ± 1,2	6,77 ± 1,1	45,5 ± 1,5	23,19 ± 5,0	523,3 ± 102,3	266,3 ± 6,5
Fluorantene	94,2 ± 5,7	108,9 ± 17,7	1218,5 ± 44,2	1192,4 ± 177,8	10154,0 ± 1218,6	11106,6 ± 897,7
Benzo(b)fluorantene	47,3 ± 14,2	51,4 ± 6,6	502,2 ± 5,3	486,6 ± 76,8	4030,7 ± 413,0	4879,9 ± 216,9
Benzo(k)fluorantene	19,3 ± 2,9	27,0 ± 5,7	153,9 ± 19,7	266,4 ± 37,2	1962,8 ± 180,8	1231,5 ± 180,7
Benzo(a)pyrene	15,9 ± 2,6	15,8 ± 2,5	197,1 ± 13,6	179,8 ± 16,8	1711,4 ± 193,7	1486,1 ± 86,4
Benzo(g,h,i)perylene	12,5 ± 6,3	14,9 ± 8,2	124,2 ± 10,4	147,5 ± 6,8	1453,2 ± 198,2	1393,6 ± 235,1
Indeno(1,2,3,c,d)pyrene	10,8 ± 3,1	11,7 ± 4,4	114,84 ± 13,2	145,8 ± 10,4	1176,0 ± 108,2	1226,8 ± 123,7

Tabella 3.3 - Concentrazioni medie dei PAH ($\text{ng g}^{-1} \pm \text{d.s.}$), espresse per peso secco di sedimento, misurate dopo 24 ore di incubazione (1giorno) e dopo 28 giorni, nel sedimento naturale (controllo) e nel sedimento trattato con miscele di PAH (10X e 100X) a concentrazioni 10 e 100 volte superiori al controllo.

Dall'osservazione delle concentrazioni dei singoli composti misurate dopo 24 ore e dopo 28 giorni di incubazione non si osservano diminuzioni significative dei componenti della miscela ad eccezione del fenantrene nel trattamento IPA 10X, unico composto a tre anelli benzenici tra le sostanze analizzate (Fig. 3.5).

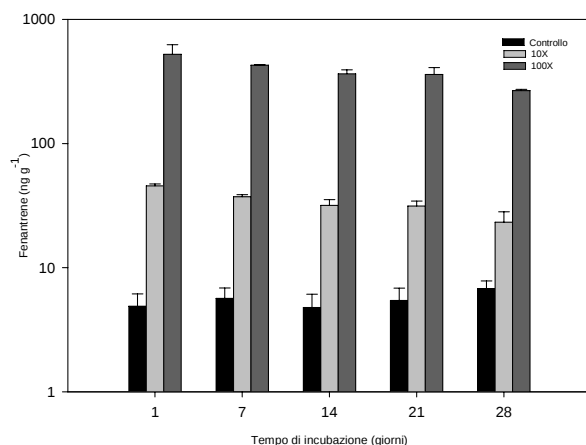


Figura 3.5 - Andamento delle concentrazioni medie ($\pm \text{d.s.}$) del fenantrene nel sedimento naturale (controllo) e in quello trattato con una miscela di PAH a diverse concentrazioni (PAH 10X e 100X) durante l'incubazione

Nel sedimento trattato con la miscela di PAH a concentrazione 10 volte superiore a quella misurata in natura e sottoposto ad un incubazione prolungata di 300 giorni, è stata osservata una completa degradazione del fenantrene ed una riduzione del 74,5 % della concentrazione di un secondo composto, il fluorantene.

3.3.2 Variazione dei parametri strutturali e funzionali della comunità microbica

Nel sedimento naturale la comunità batterica mostra un numero di cellule pari a $7,26 \pm 0,54 \cdot 10^8$ cellule g^{-1} . L'andamento delle abbondanze batteriche nel sedimento in seguito ai trattamenti è riportato nella figura 3.6. Ad eccezione di un'elevata variabilità delle abbondanze all'inizio dell'esperimento (1 giorno), la miscela di PAH non ha prodotto, nei tempi successivi, andamenti significativi delle abbondanze cellulari rispetto al controllo.

All'inizio dell'esperimento, la concentrazione di ATP in tutti i trattamenti non differisce dal valore misurato *in situ* ($2,56 \pm 0,06 \mu g \cdot g^{-1}$) (Fig. 3.6). Dopo una settimana di contatto con i PAH, in entrambi i trattamenti non si osservano differenze significative della concentrazione di ATP rispetto ai valori iniziali. Nelle settimane successive si osserva invece un andamento negativo della concentrazione di ATP nel tempo in entrambi i trattamenti (10X: $r = -0,85$, $p < 0,01$, $n = 9$; 100X: $r = -0,89$; $p < 0,01$; $n = 9$). Al contrario nel controllo si osserva un incremento lineare della concentrazione di ATP ($r = 0,83$; $p < 0,05$; $n = 9$) i cui valori alla fine dell'esperimento superano significativamente quelli osservati in entrambi i trattamenti (t-test; $p < 0,01$).

La produzione procariotica di carbonio (PCP) nel campione naturale risulta pari a $0,7 \pm 0,2 \mu mol \cdot C \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$, valore confrontabile con quello ottenuto in questo studio nelle indagini di campo (Fig. 3.6).

I trattamenti con la miscela di PAH inducono un incremento dei tassi di produzione rispetto al controllo già dopo 24 ore dal contatto (t-test; $p < 0,01$). Questa differenza rispetto al controllo si mantiene nei tempi successivi in tutti i trattamenti (test ANOVA; $p < 0,05$) con un incremento lineare di PCP durante le prime due settimane di contatto (10X: $r = 0,79$; $p < 0,05$; $n = 42$; 100X: $r = 0,94$; $p < 0,01$; $n = 42$). In particolare dopo 2 settimane dal trattamento, nel trattamento 10X si osservano i valori massimi di produzione che superano di circa 2 volte quelli osservati nel controllo. È interessante notare come nel sedimento non trattato (controllo) il picco di attività è più ridotto ($1,3 \pm 0,3 \mu mol \cdot C \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) e si manifesta con una settimana di anticipo rispetto ai sedimenti trattati.

Nel campione naturale di sedimento utilizzato in questo test è stato osservato un tasso di respirazione pari a $0,09 \mu\text{mol C h}^{-1} \text{g}^{-1}$ (Fig. 3.6), valore riconducibile a quello misurati *in situ*. Dopo 24 ore dal contatto con la miscela di PAH, il tasso di respirazione nei sedimenti trattati ($0,03 \pm 0,01$ e $0,02 \pm 0,004 \mu\text{mol C h}^{-1} \text{g}^{-1}$) risulta essere di circa dieci volte inferiore al controllo ($0,10 \pm 0,01 \mu\text{mol C h}^{-1} \text{g}^{-1}$). Nei tempi successivi di incubazione è stato osservato un incremento lineare del tasso di respirazione nei sedimenti di entrambi i trattamenti (IPA 10X: $r=0,93$ $p<0,0001$ $n=11$; IPA 100X: $r=0,97$ $p<0,00001$ $n=11$) fino al raggiungimento, dopo 21 giorni, del valore osservato nel controllo (valore medio $0,8 \pm 0,01 \mu\text{mol C h}^{-1} \text{g}^{-1}$).

I dati relativi alle analisi del campione naturale (*in situ*, Fig. 3.6) utilizzato per l'esperimento hanno mostrato le attività di aminopeptidasi (AMA = $0,18 \pm 0,02 \mu\text{mol AMC h}^{-1} \text{g}^{-1}$) e di fosfatasi alcalina (APA = $0,60 \pm 0,03 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{g}^{-1}$) simili sia a quelle riscontrate nei campioni naturali delle indagini di campo sia a quelle riportate per i sedimenti di altri fiumi temporanei della Regione Mediterranea (Romani *et al.*, 1998, Zoppini *et al.*, 2010). In particolare l'AMA risulta più stimolata nei sedimenti trattati che nel controllo (ANOVA, $p<0,05$), raggiungendo picchi di attività pari a $0,23 \pm 0,01$ e $0,24 \pm 0,004 \mu\text{mol AMC h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, nel trattamento 10x e 100x rispettivamente. L'incremento rispetto al controllo rimane invariato fino alla fine dell'esperimento per entrambi i trattamenti, nonostante il tasso di idrolisi tenda a diminuire nel tempo con andamento lineare in tutti i trattamenti (controllo $r=-0,79$ $p<0,05$ $n=9$; 10X $r=-0,95$ $p<0,0001$ $n=9$; 100X $r=-0,99$ $p<0,000001$ $n=9$). Pur non mostrando differenze significative tra loro, i trattamenti con le miscele di PAH mostrano attività di APA superiori a quelle del controllo fino a una settimana dal contatto (test ANOVA; $p < 0,05$) quando si osserva il picco di attività ($0,55 \pm 0,02 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{g}^{-1}$). Nei tempi successivi l'APA diminuisce progressivamente in tutti i trattamenti ($r = -0,67$ $p < 0,05$ $n = 9$; $r = -0,76$ $p < 0,05$ $n = 9$).

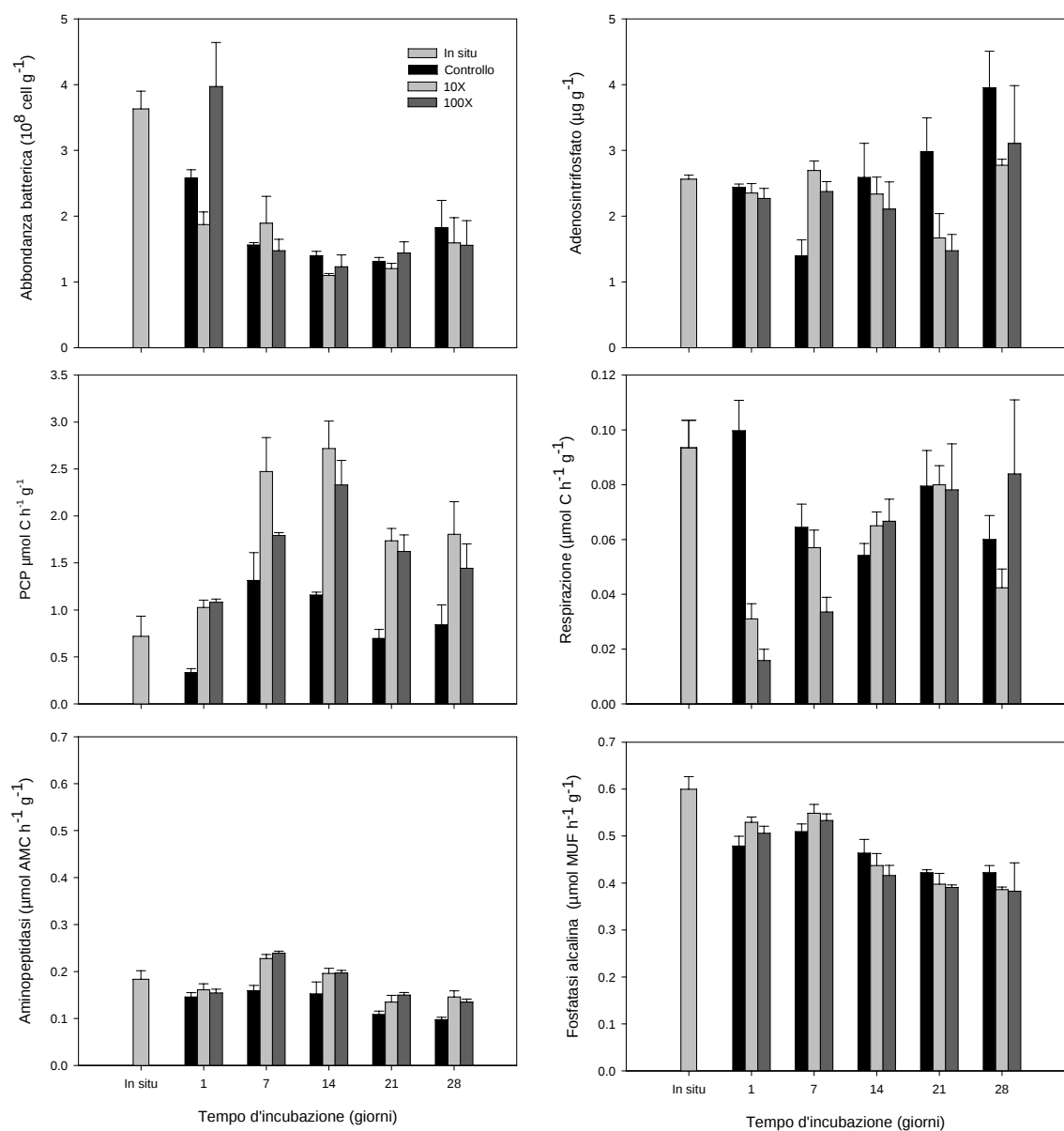


Figura 3.6 - Valori medi ($\pm$ d.s.) di abbondanza batterica, concentrazione di ATP, produzione procariotica di C, respirazione e attività enzimatica extracellulare (amino peptidasi, fosfatasi alcalina) nel controllo e nei trattamenti (10X e 100X). I valori sono espressi per grammo di sedimento secco.

4. DISCUSSIONE

I cambiamenti climatici influenzano il ciclo idrologico e con questo l'andamento delle piogge (Huntington *et al.*, 2006, Wu *et al.*, 2010; Huntjens *et al.*, 2010). Le aree mediterranee sono state definite come “hot spots” poiché in conseguenza dei cambiamenti climatici sono a rischio siccità (Giorgi *et al.*, 2006; EEA, 2008). I fiumi temporanei, dominanti nelle aree semi-aride del pianeta, sono sistemi molto fragili a causa dell'elevata variabilità idrologica. L'incremento dell'aridità può modificare ulteriormente l'equilibrio altamente instabile di questi ecosistemi e ridurre la disponibilità, e la qualità, dell'acqua per le popolazioni residenti. In questa tesi si riportano i dati relativi ad indagini condotte sia *in situ* che in laboratorio sul fiume temporaneo Candelaro (Puglia), che rappresenta uno dei sistemi fluviali compresi nell'area mediterranea oggetto di studio del Progetto Europeo MIRAGE. Lo scopo è stato quello di misurare in condizioni idrologiche estreme (piena / siccità) la variazione dello stato di qualità dei sedimenti relativamente alle sostanze definite pericolose per l'ambiente e la salute umana e alle comunità microbiche, attraverso la descrizione delle variazioni dei parametri strutturali e funzionali che possono influenzare il flusso di nutrienti. Le indagini di campo hanno permesso di descrivere lo stato di qualità del sistema nelle diverse fasi idrologiche, dove periodi di siccità influenzano la composizione chimica del sedimento ed i processi metabolici delle comunità microbiche residenti nel sedimento. Test di laboratorio hanno permesso inoltre di misurare in condizioni controllate le risposte delle comunità microbiche alla siccità ed il destino di microinquinanti (PAH) presenti nell'ambiente naturale.

4.1 Il sito di studio e i microinquinanti

L'area di studio, che comprende il sistema fluviale Celone-Candelaro, è interessata da impatto antropico prevalentemente dovuto ad attività agricole e pastorizia. I parametri misurati nell'ambito di questa indagine descrivono come l'impatto influenzi in maniera diversa le sezioni monte/valle del bacino idrografico. In indagini recenti ai diversi tratti analizzati del sistema Celone-Candelaro sono stati attribuiti livelli di qualità biologica che variavano tra “sufficiente” e “scadente” (Armanini *et al.*, 2008). L'analisi chimica dei sedimenti ha mostrato un elevato stato trofico dei sedimenti con elevato contenuto di nutrienti (TOC e TN) e sostanza organica (AFDW). Tali concentrazioni risultano superiori a quelle di sedimenti di altri fiumi temporanei dell'area mediterranea a scarso impatto antropico (Zoppini *et al.*, 2010; Tzoraki *et al.*, 2007). Le varie condizioni idrologiche

modificano le caratteristiche chimiche del sedimento. I maggiori contributi di sostanza organica (AFDW) e di carbonio organico particolato (TOC) si osservano durante la fase di piena, e probabilmente dovuti da apporti di origine terrestre. La riduzione del flusso d'acqua determina una riduzione degli apporti di sostanza organica (ridotto AFDW e TOC) con la possibile conseguenza di accumulo di materiale refrattario. Quando la stagione secca avanza questa tendenza va progressivamente intensificandosi con ripercussioni sui flussi di materia tra la fase disciolta e la biomassa come discusso di seguito.

Le conoscenze scientifiche sulla dinamica delle sostanze inquinanti nei fiumi temporanei sono pressoché inesistenti. In questi ambienti, la variabilità idrologica dovuta all'alternanza ciclica di periodi di siccità e inondazioni, influisce sulla biodisponibilità della sostanza organica e degli inquinanti. Durante i periodi di siccità, il sedimento è direttamente esposto ai raggi solari e alle alte temperature con conseguente diminuzione del contenuto d'acqua che modifica lo stato di aggregazione delle particelle. Questi cambiamenti alterano le interazioni tra il sedimento e gli inquinanti influenzando sulle capacità di adsorbimento del sedimento, sulla mobilità e volatilizzazione, e sui processi di degradazione (Ademollo *et al.*, 2011). Nel sistema fluviale Celone-Candelaro emerge una contaminazione significativa dei sedimenti da parte di alcuni composti appartenenti alla classe degli idrocarburi policiclici aromatici (PAH) e alchilfenoli (NPs) con poche eccezioni (tabella 3.5). Scarse sono le informazioni sui limiti di queste sostanze nei sedimenti, incluse nella lista delle sostanze pericolose della EU WFD (2000/60/EE). Attualmente sono disponibili solo le linee guida del Governo Canadese (CCME, 1998), rispetto alle quali nella presente indagine la concentrazione di benzo(a) pirene BaP risulta essere inferiore al limite ($31,9 \text{ ng g}^{-1}$) mentre quella del fluorantene supera il valore limite ($11,0 \text{ ng g}^{-1}$) in quattro campioni su nove. Le concentrazioni di entrambi i composti sono comunque al di sotto del Livello Probabile di Effetto riportato in letteratura (PEL: 2355 ng g^{-1} per il fluorantene e 782 ng g^{-1} per il benzo (a)pirene). Per i restanti PAH misurati in questa indagine, non si conoscono al momento limiti per i sedimenti. Confrontando questi dati con quelli disponibili in letteratura (Yunker *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007; Barra *et al.*, 2009; Navarro-Ortega *et al.*, 2010), possiamo concludere che i sedimenti campionati sono affetti da un inquinamento medio alto. Non si hanno attualmente informazioni sulla contaminazione di PAH di altri fiumi temporanei.

Le concentrazioni di NP misurate nel sedimento del sistema fluviale Celone-Candelaro sono coerenti con i dati riportati in letteratura per sedimenti fluviali moderatamente inquinati (Thiele *et al.*, 1997). Le elevate concentrazioni di NP osservate nei sedimenti ad

elevate condizioni di flusso possono essere spiegate con il trasporto nel fiume di pesticidi associati a materiale terrigeno, trasportato nel fiume dalle intense precipitazioni. Le aree adiacenti sono infatti probabilmente contaminate da pesticidi per via delle pratiche di agricoltura intensiva, e d'altronde elevate concentrazioni di pesticidi sono state rilevate negli stessi sedimenti (S. Polesello, comunicazione personale). La riduzione delle concentrazioni (NP) nella stazione di chiusura può essere spiegata con la diluizione operata dal sistema ricevente (fiume Candelaro). Ad oggi non sono disponibili dati sulla contaminazione degli NP nei sedimenti di fiumi temporanei, né i valori standard (EQS) né tantomeno il livello probabile di effetto (PEL). Comunque si possono avere indicazioni estrapolando lo standard di qualità da modelli (QSSed) da cui si evince che la soglia di concentrazione per gli NP è pari a 180 ng g^{-1} (CIS, 2005). Le concentrazioni misurate nella presente indagine superano questa soglia in tutti i campioni analizzati.

Gli eventi di siccità svolgono un ruolo importante nel modificare la concentrazione dei microinquinanti analizzati nei sedimenti, in quanto le concentrazioni più ridotte sono state osservate nei sedimenti secchi ed in particolare in quelli esposti, in estate, direttamente all'aria e ai raggi solari per diverse settimane. Si può escludere la volatilizzazione perché da studi paralleli non si è osservata nessuna relazione significativa con la perdita preferenziale di composti a basso peso molecolare (L. Patrolecco comunicazione personale). E' probabile che l'idrofobicità di questi composti spieghi questo risultato. La perdita di umidità aumenta le capacità sorbitive dei sedimenti per i composti organici ed inorganici (Choi *et al.*, 2001).

Nei suoli è stato osservato come cicli di umido-secco aumentino la biodisponibilità del fenantrene (White *et al.*, 1998). Altri Autori dimostrano come il tasso di volatilizzazione dei PAH si riduca durante il processo di essiccazione di suoli e sedimenti contaminati (Valsaraj *et al.*, 1997, Ravikrishna *et al.*, 1998). La biodisponibilità potrebbe essere aumentata dal sequestro delle molecole che vanno ad occupare siti remoti all'interno della matrice del suolo associata a materiale di origine umica. La restrizione e l'espansione della sostanza organica al passaggio dallo stato secco a quello umido può causare quindi la diffusione del substrato al di fuori di regioni inaccessibili, rendendole così biodisponibili alla degradazione batterica. In particolare, i processi microbici di mineralizzazione svolgono un ruolo fondamentale degradando completamente i contaminanti o trasformandoli in molecole polari e metaboliti più solubili, influenzando il loro trasporto e la loro distribuzione nell'ambiente. Al fine di comprendere i meccanismi di perdita dei PAH nel sedimento secco rispetto a quello umido, sono state calcolate le percentuali di

perdita di ciascun gruppo di composti che differiscono tra di loro per il numero di anelli aromatici: 4 anelli 83%, 5 anelli 71% e 6 anelli 88%. Pur non osservando un trend chiaro, si può escludere il fenomeno della volatilizzazione perché spesso è maggiore la perdita degli isomeri a più alto peso molecolare; può giocare invece un ruolo chiave nella fotodegradazione o nel sequestro nel sedimento la caratteristica di essere composti altamente idrofobici. Anche la letteratura riporta tassi di degradazione variabili per questi composti (Pagni e Sigman, 1999; Krauss e Wilke, 2002) avvalorando la tesi dell'importanza della qualità della materia organica e delle caratteristiche strutturali delle molecole di PAH. Infatti strutture planari potrebbero facilitare l'adsorbimento dei PAH in posizioni meno accessibili per i radicali OH, promotori delle reazioni di degradazione fotochimica.

È interessante inoltre notare come la concentrazione di PAH nel sedimento della stazione 1, situata in un'area scarsamente antropizzata, sia comunque elevata. Questo risultato può essere spiegato dalla diffusione di questi microinquinanti per via aerea, modalità attraverso cui queste sostanze raggiungono anche aree remote (Mazzera *et al.*, 1999; McDonald *et al.*, 1992).

4.2 La risposta in situ delle comunità microbiche alla variazione dei fattori ambientali

Le caratteristiche della comunità microbica del sedimento, descritte attraverso i parametri funzionali e strutturali, forniscono interessanti informazioni sullo stato del sedimento e le diverse modalità con cui circola la sostanza organica ed i nutrienti.

La variabilità idrologica influisce sulla qualità e la disponibilità dei substrati organici con ripercussioni sui processi di assimilazione e mineralizzazione (Schiller *et al.*, 2010, Ylla *et al.*, 2010, Zoppini *et al.*, 2010). L'osservazione dei dati di campo mostra un'elevata variabilità, indice di instabilità dei fattori ambientali dove la variabilità del flusso idrico produce cambiamenti drastici a livello di micro-ecosistema. Durante i periodi di restrizione del flusso idrico (ottobre) o di assenza totale (agosto) ampie aree del letto del fiume sono risultate emerse sebbene in diversi stati di idratazione. La siccità è stata citata come la più seria dei disastri naturali per via della riduzione di forme vitali, l'impatto sulla produzione agricola e l'economia (Wilhite, 2000), sebbene rappresenti un evento naturale per molti corpi idrici dell'area mediterranea (McMahon e Finlayson, 2003). Il processo di essiccazione modifica la chimica dei sedimenti e del suolo, uccidendo tre quarti della popolazione microbica residente (De Groot e Van Wijck, 1993, Baldwin 1996, Qiu e McComb, 1995). Nelle aree semi-aride del pianeta è stato descritto come eventi di siccità

modifichino le funzioni della comunità bentonica, rallentando i tempi di decomposizione del detrito e la densità della comunità di macroinvertebrati (Fonnesu *et al.*, 2004, Larned *et al.*, 2007). Nella presente indagine condotta sul sistema Celone-Candelaro il valore medio dell'abbondanza batterica e della respirazione sono risultati simili a quelli osservati in altri fiumi temporanei con trofia meno elevata, mentre i valori di produzione batterica risultano significativamente più elevati (Marxsen *et al.*, 2010; Zoppini *et al.*, 2010). Il valore medio dei tassi di respirazione corrisponde a circa un terzo della incorporazione di carbonio. Infatti, in questa indagine il rapporto tra i tassi di produzione di carbonio e quelli di respirazione risulta sempre a favore della prima, stando a significare che la comunità microbica è in grado di incorporare in maniera efficiente i substrati organici presenti nell'ambiente, limitando la dissipazione dell'energia in CO₂. I tassi di PCP misurati equivalgono a velocità di crescita molto elevate (media μ 1,7 $\pm$ 0,9 giorni) e tempi di turnover inferiori ad 1 giorno in tutti i campioni esaminati. Il momento di piena insieme alle condizioni estive (vedi il campione di luglio) producono picchi nella velocità di assimilazione del C così come i tassi più elevati di mineralizzazione della sostanza organica. Questi risultati sono in linea con l'elevata disponibilità di substrato organico e nutrienti riscontrati in questi campioni. Le condizioni estive inoltre, per via dell'elevata temperatura e di una maggiore disponibilità di luce, stimolano probabilmente la componente autotrofa del sedimento (non misurata in questa indagine) che contribuisce ad alimentare a sua volta la componente eterotrofa (Wilczek *et al.*, 2004). L'instaurarsi di questa condizione genera in genere una competizione autotrofi/eterotrofi per il reperimento del P inorganico che stimola l'attività dell'enzima extracellulare delle fosfatasi alcalina responsabile per entrambi i compartimenti dell'idrolisi del P-organico (Hoppe *et al.*, 2003, Wilczek *et al.*, 2004).

L'attività degli enzimi extracellulari rispecchia le caratteristiche della sostanza organica disponibile (Artigas *et al.*, 2008). Il calcolo del rapporto tra le attività di aminopeptidasi e di fosfatasi alcalina (APA:AMA) è utilizzato come indicatore delle modificazioni della qualità della sostanza organica. In questa indagine tale rapporto non mostra sostanziali differenze tra i diversi campioni risultando pari a 1 nella grande maggioranza dei campioni. La condizione di flusso elevato stimola tutte le attività enzimatiche extracellulari testate ad indicare una maggiore variabilità della qualità del substrato organico su cui i microrganismi si alimentano. In particolare i picchi di attività della beta-glucosidasi e della lipasi riflettono la presenza di substrati carboniosi (polisaccaridi e lipidi) i cui prodotti (carboidrati e acidi grassi) alimentano i processi

catabolici. In letteratura gli elevati tassi di respirazione sono associati a condizioni idrologiche di piena e all'abbondanza di materiale particolato (Jones *et al.*, 1995), così come osservato nella presente indagine. La stazione 3, posta nella parte terminale del bacino idrografico, mostra in generale attività enzimatiche extracellulari molto elevate a testimonianza degli elevati apporti di sostanza organica.

Le condizioni di siccità più spinta determinano nel sedimento rimasto emerso profondi cambiamenti della comunità microbica con drastiche riduzioni delle abbondanze cellulari e della produzione procariotica di C che risultano essere pari ad un terzo rispetto a quelle osservate nel sedimento saturo. Da queste osservazioni si deduce che nel sedimento secco le attività di mineralizzazione e sintesi di nuova biomassa, sebbene ridotti, non cessino completamente. Dai dati ottenuti si è stimato una velocità di crescita della comunità microbica ridotta ($\mu=0,61\pm0,05$) e tempi di turnover superiori ad 1 giorno. In queste condizioni le attività enzimatiche extracellulari specifiche per i substrati polisaccaridici e lipidici si riducono ma si conservano quelle indispensabili per il reperimento del C, N (aminopeptidasi) e P (fosfatasi alcalina). Il valore più elevato del rapporto APA:AMA è stato ottenuto nel sedimento secco di agosto (APA:AMA= 3,2) a testimonianza dell'importanza dell'attività della fosfatasi alcalina in condizioni di siccità.

Lo stress idrico è letale per le cellule batteriche a causa del danneggiamento delle membrane, delle proteine e degli acidi nucleici (Billi e Potts 2002). La capacità di sopravvivenza delle attività enzimatiche richiama i meccanismi di difesa adottati dalle specie batteriche che tollerano la mancanza di acqua, attraverso l'accumulo di proteine e la capacità di produrre sostanze extracellulari ricche di polisaccaridi (EPS) per favorire la protezione degli enzimi (Billi e Potts, 2002, Sirová *et al.*, 2006). Da presente indagine si deduce l'importanza delle comunità microbiche nella circolazione dei nutrienti e degli inquinanti in condizioni ritenute impossibili per il resto degli organismi viventi.

Appendice 2 - Flusso dei nutrienti e attività enzimatiche extracellulari

Il grafico riportato nella figura 3.7 riporta un'elaborazione che riunisce le misure delle attività enzimatiche di due fiumi temporanei dell'area Mediterranea e la loro variazione in funzione delle variabili chimico-fisiche (Romani *et al.*, 2012). In entrambi i fiumi i valori più elevati sono associati alle attività di aminopeptidasi (AMA) e di fosfatasi alcalina (APA). Dal grafico appare evidente come queste due attività siano associate alla granulometria del sedimento: la fosfatasi alcalina è associata al sedimento sabbioso (0,05-0,5 mm) mentre l'aminopeptidasi a quello grossolano (2-0,5 mm). Entrambe le attività sono poi associate a scarso contenuto di C e/o N, e P. L'interpretazione dell'attività degli andamenti dell'attività di peptidasi è complessa perché è un enzima anfibolico, potenzialmente importante sia per la degradazione del C che per l'acquisizione del P. La predominanza di AMA in sedimenti grossolani è stata osservata in letteratura in ambienti poveri di nutrienti, dove la comunità microbica può contare sui prodotti di questa attività (aminoacidi) per ottenere sufficienti quantità di azoto organico (Rusch *et al.*, 2003).

L'attività di fosfatasi alcalina è invece associata al TOC, e al sedimento fine, probabilmente povero di P. Il contenuto di acqua dei sedimenti sembra avere poco effetto su questa attività in linea con quanto osservato in precedenti esperimenti (Zoppini e Marxsen, 2011). Inoltre le comunità microbiche di sedimenti fini, scarsi in azoto, possono contare sulla beta-glucosidasi e lipasi per ottenere substrati organici per alimentare il catabolismo. È stata osservata infatti una interdipendenza tra la respirazione e queste due attività che liberano substrati ricchi di energia da utilizzare nei processi catabolici. I prodotti dell'attività di beta-glucosidasi e lipasi rappresentano infatti risorse biodisponibili ricche di energia (Zoppini *et al.*, 2010). L'associazione di questi enzimi con l'AFDW lascia anche presupporre la presenza di una varietà di substrati molto variegata probabilmente ricchi di N e P, indispensabili all'assimilazione di substrati carboniosi.

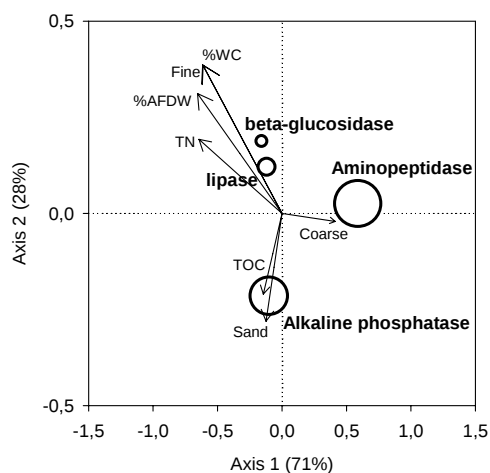


Figura 3.7 – Analisi canonica delle corrispondenze

L'analisi canonica delle corrispondenze evidenzia le associazioni tra le attività enzimatiche e le caratteristiche dei sedimenti analizzati. Le variazioni ambientali spiegano le differenze delle attività enzimatiche nell'asse 1 e 2 rispettivamente per il 71% e 28%. La lunghezza delle frecce è proporzionale alla lunghezza del vettore. Il diametro dei cerchi è proporzionale ai valori dell'attività enzimatica. WC= water content; AFDW=Ash Free Dry Weight; TOC= Total Organic Carbon; TN=Total Nitrogen; Fine= <0,2 mm sediment grain size; Sand= 0,2-0,5 mm sediment grain size; Coarse: 0,5-2,0 mm sediment grain size. (da Romani *et al.* 2012)

La conoscenza dei tassi di respirazione della comunità microbica permette la descrizione dei processi di mineralizzazione della sostanza organica e dei flussi di energia (Hille e Gardner, 1987; Hall e Meyer, 1998; Hill *et al.*, 2000). La respirazione è il risultato

di complesse interazioni tra le risorse disponibili e i fattori ambientali (Jones *et al.*, 1995; Uehlinger e Naegeli, 1998; Mulholland *et al.*, 2001; Mulholland *et al.*, 2005). I dati disponibili sui tassi di respirazione nel sedimento sono scarsi e spesso poco confrontabili perché ottenuti utilizzando differenti metodologie. Nella presente indagine, la respirazione della comunità eterotrofa è stata misurata utilizzando camere di incubazione, già utilizzate per sedimenti di fiumi di aree semi-aride (Jones *et al.*, 1995; Uehlinger *et al.*, 2002), nonostante pongano limitazioni metodologiche (Doering, 2007; Zoppini *et al.*, 2010). I valori misurati in questo studio variano tra 0,07-0,19 $\mu\text{mol C h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Questi tassi cadono al di fuori degli intervalli di valori (0,00071-0,020 $\mu\text{mol C h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) riportati in letteratura da Heyer e Kalfs (1998) per sedimenti che si differenziano significativamente per la concentrazione di TOC. I valori più elevati si osservano nel sedimento prelevato a luglio in tutte le stazioni, nel momento di piena, quando il TOC incrementa di un fattore di grandezza rispetto al resto dei valori osservati. L'incremento significativo di questi valori può essere stimolato dagli input elevati di sostanza organica di probabile origine alloctona (tabella 3).

4.3 Stima dei flussi di carbonio *in situ*

Dalla somma dei dati ottenuti dalla misura dei tassi di respirazione (R) della comunità microbica e di produzione procariotica (PCP) è possibile calcolare il tasso del flusso di carbonio mediato dalla comunità microbica residente nel sedimento (frazione dimensionale < 2 mm). I valori massimo e minimo stimati in questa indagine sono compresi tra 0,1 e 1,0 $\mu\text{mol C h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Considerando questi tassi possiamo stimare una velocità di assimilazione giornaliera di C compresa tra 3 e 20 $\mu\text{mol C g}^{-1}$. Dal rapporto PCP/R si può stimare che della suddetta quantità di C assimilato su base giornaliera l'attività di respirazione ne mineralizza tra il 22 ed il 50%. Si deve considerare che l'insieme della sostanza organica disponibile in un ecosistema acquatico riunisce molecole di diverso genere in termini di qualità e non tutte direttamente disponibili al consumo microbico (Taylor *et al.*, 2003; Jiao *et al.*, 2010). Quindi considerare tutta la sostanza organica come biodisponibile può dar luogo ad una sottostima dei tassi di assimilazione mediati dalla comunità microbica. Da questi dati si deduce come l'attività delle comunità microbiche sia responsabile del flusso di un'aliquota significativa del carbonio organico contenuti nei sedimenti i cui tassi risultano essere significativi ma anche molto variabili in funzione delle variabili ambientali.

Dall'analisi delle abbondanze batteriche possiamo ricavare la biomassa ad esse associata applicando un fattore di conversione pari a 20 fg di C per cellula, suggerito da Lee e Fuhrman (1987), ed ampiamente utilizzato in letteratura. La biomassa procariotica costituisce da 0,1 a 4,4 μmol di C per grammo di sedimento secco, osservate entrambe a luglio e nei siti 1 e 3 rispettivamente. Il contenuto di carbonio organico totale (TOC), che include il carbonio organico derivante sia da organismi che da detrito, è tra lo 0,4 e 2% del peso secco. Considerando, quindi, un contributo medio di TOC nel sedimento pari all' 1% la biomassa procariotica contribuisce tra lo 0,2 e lo 0,65%.

Analizzando i dati ottenuti dalle attività enzimatiche extracellulari (tabella 3.2) si osserva come i vari composti siano utilizzati a diverse velocità nei diversi siti e nelle diverse stagioni. Le attività enzimatiche idrolizzano substrati polimerici per ricavare monomeri utili al metabolismo cellulare. In questa indagine la variabilità delle loro attività riflette la variabilità stessa dei substrati disponibili che variano in funzione delle condizioni ambientali (tabella 3). Valori elevati si sono osservati per l'attività della fosfatasi alcalina e dell'aminopeptidasi che svolgono un ruolo importante per il ciclo dei nutrienti perché dalla loro attività si libera fosforo inorganico e aminoacidi, includenti carbonio e azoto, elementi indispensabili al metabolismo cellulare. La loro elevata attività denota quindi limitazione da nutrienti (P e N) ed elevata disponibilità di materiale polimerico da idrolizzare con queste caratteristiche specifiche. I picchi di attività della beta-glucosidasi e della lipasi (stazione 3) descrivono invece una elevata attività su substrati carboniosi (polisaccaridi e lipidi) i cui prodotti (carboidrati e acidi grassi) alimentano i processi catabolici. Dai dati di questa indagine si stima che l'attività di fosfatasi alcalina sia potenzialmente responsabile del rilascio medio di 0,6 μmol di P al giorno per grammo di sedimento e come il resto delle attività rilasci complessivamente 13 μmol di C al giorno. Da questi dati si deduce l'elevata importanza della comunità microbica in questi sedimenti per il flusso dei nutrienti e particolarmente nelle condizioni estive immediatamente successive al picco di portata, quando sono stati osservati anche i picchi delle attività misurate.

Se si considera il rapporto di Goldman (C:N:P=45:9:1) che stabilisce i rapporti molari con cui nel metabolismo batterico viene assunta la sostanza organica, l'azoto ed il fosforo, possiamo osservare come il P potenzialmente rilasciato dall'attività della fosfatasi su base giornaliera (0,60 $\mu\text{mol P g}^{-1}$) riesca a superare di oltre due volte il fabbisogno stimato con il rapporto di Goldman (0,26 $\mu\text{mol P / g}$) necessario per assimilare mediamente in un giorno 11,8 $\mu\text{mol C g}^{-1}$, ottenuto dalla somma di R+PCP. Questa frazione di C e P potenzialmente rilasciata in un giorno dalle attività enzimatiche è costituita da molecole

biodisponibili responsabili della sintesi di nuova biomassa. In questa indagine sperimentale i picchi di fosfatasi e di lipasi, osservati in luglio in fase di piena (Fig. 3), coincidono anche con quelli delle abbondanze batteriche e della respirazione. I prodotti della lipasi, gli acidi grassi, sono infatti substrati ricchi di energia utili ai processi catabolici, così come il fosforo rilasciato, dall'azione della fosfatasi, può contribuire alla sintesi di nuova biomassa in un momento in cui il P sembra essere limitante.

Da questi dati si deduce come l'attività delle comunità microbiche sia responsabile del flusso di un'aliquota significativa del carbonio organico e dei nutrienti contenuti nei sedimenti i cui tassi risultano essere significativi ma anche molto variabili in un sistema ad elevata variabilità idrologica.

4.4 Effetto della siccità

L'idrologia dei fiumi temporanei è caratterizzata da drastici cambiamenti della portata passando da periodi di piena a prolungati periodi di siccità. È stato osservato come sia nel sedimento che nel suolo il periodo di siccità alteri le caratteristiche chimiche (De Groot e Van Wijck, 1993) così come quelle degli organismi microbici (Qiu e McComb, 1995) influenzando parametri metabolici della comunità (Fierer *et al.*, 2003; Amalfitano *et al.*, 2008; Fazi *et al.*, 2007) e la disponibilità di nutrienti e sostanza organica (Austin *et al.*, 2004, Darrel e Lal, 2005). I fenomeni di inondazione possono invece influenzare la distribuzione (Holmes *et al.*, 1998) e l'attività della comunità microbica incluse le reazioni di trasformazione e mineralizzazione della sostanza organica (Baldwin e Mitchell, 2000; Burns e Ryder, 2001; Belnap *et al.*, 2005; Romani *et al.*, 2006).

Nell'ambito delle indagini condotte per il Progetto Europeo MIRAGE il sedimento del fiume Celone è stato raccolto durante un periodo di siccità durato diverse settimane (agosto 2010). Il sedimento è stato reidratato in laboratorio, in condizioni controllate, per stimare le dinamiche di riattivazione della comunità microbica bentonica. Il quadro generale dei risultati ottenuti rileva un rapido recupero delle principali attività metaboliche nell'arco delle 24 ore.

La comunità microbica, pur essendo in grado di raddoppiare il numero delle cellule in 12 ore, non raggiunge i valori misurati *in situ*, in condizioni di normale flusso idrico, né quelli riportati in letteratura per sedimenti aerobici (Findlay *et al.*, 2002, Fischer *et al.*, 2002, Amalfitano *et al.*, 2008, Zoppini *et al.*, 2010, Marxsen *et al.*, 2010). I valori più elevati di abbondanza cellulare raggiunti dopo l'aggiunta dell'acqua sono invece vicini a

quelli osservati da Holmes *et al.*, (1998) nel sedimento di fiumi efemerale nel periodo successivo la siccità, subito dopo il ristabilirsi delle condizioni di flusso.

L'attivazione della produzione procariotica di carbonio, il cui incremento si osserva già dopo sei ore dal ritorno dell'acqua, è gran parte sostenuta dall'attività idrolitica dell'aminopeptidasi essendo le due attività significativamente correlate ($r=0,78$, $p<0.05$, $n=7$). In particolare la PCP è in grado di raggiungere in 12 ore valori simili a quelli riscontrati in natura. L'incremento della PCP avviene in due fasi: una molto rapida che avviene nelle prime 12 ore dall'evento di idratazione ed una più lenta nelle ore successive. In questo esperimento i valori più elevati di PCP, raggiunti dopo una settimana, sono riconducibili a quelli misurati *in situ* in condizioni di scarsità di flusso ma più elevati di quelli riscontrati in altri fiumi temporanei dell'area mediterranea (Amalfitano *et al.*, 2008, Zoppini *et al.*, 2010).

La respirazione della comunità microbica, valutata mediante il metodo ETS, mostra un incremento significativo già dopo sei ore dalla reidratazione, raggiungendo il massimo valore dopo una settimana di incubazione. I valori massimi, ottenuti in questo esperimento con la tecnica di ETS, si possono confrontare con quelli medi ($0,018 \pm 0,008 \mu\text{mol C h}^{-1} \text{g}^{-1}$) riportati in letteratura da Zoppini *et al.* (2010) ottenuti con le camere di incubazione nel sedimento di un fiume temporaneo, che da Trevor *et al.*, (1982) ottenuti con il metodo ETS nel suolo. I valori dell'esperimento di idratazione (Fig. 3.2, metodo ETS) risultano invece più bassi se confrontati con quelli misurati *in situ* in questa indagine (media $0,13 \pm 0,05 \mu\text{mol C h}^{-1} \text{g}^{-1}$, metodo camere incubazione).

Il recupero dell'attività di respirazione è correlato all'aumento della concentrazione di ATP ($r=0,74$, $p<0,00001$ $n=31$). La dipendenza tra questi due parametri è stata osservata anche da Jones e Simon (1979) in uno studio su campioni di suolo a dimostrazione della stretta dipendenza dei due processi nel processo di riattivazione metabolica dopo stress idrico. Nelle prime ore dalla reidratazione la concentrazione di ATP aumenta di circa un ordine di grandezza, dimostrando il rapido recupero di vitalità delle comunità residenti. Tale recupero è poi seguito da una prolungata fase stazionaria, che coincide con il progressivo recupero del resto delle attività necessarie al pieno ristabilimento delle attività metaboliche. Il picco di concentrazione si osserva dopo dieci giorni quando massima è la velocità di respirazione. Simili andamenti sono stati descritti nel suolo nelle fasi successive alla reidratazione (Raubuch *et al.*, 2002; De Nobili *et al.*, 2006).

In un esperimento parallelo sono state misurate le variazioni del numero di spore e delle abbondanze batteriche nei tempi successivi la reidratazione. Le spore sono forme

quiescenti contenenti gli elementi essenziali della cellula. Si formano in alcune specie batteriche, Gram positivi e clostridi, se le condizioni ambientali diventano sfavorevoli; in condizioni favorevoli, le spore danno origine a forme vegetative che tornano in attiva riproduzione. Le spore sono molto resistenti agli agenti chimici e fisici e reagiscono a condizioni ambientali proibitive. La spora contiene citoplasma e acqua e sopravvive anche per molti anni in condizioni ambientali avverse. La germinazione avviene, se l'ambiente circostante torna ad essere favorevole, in tre fasi: attivazione (la spora diventa permeabile), germinazione (nella spora penetra acqua e sostanza organica, specifici enzimi favoriscono l'ingresso delle sostanze), accrescimento durante cui gli involucri sono eliminati e la cellula produce macromolecole per il metabolismo e le nuove strutture cellulari. L'accrescimento si protrae fino alla prima divisione cellulare.

Nell'esperimento di reidratazione si osserva la diminuzione significativa del numero di spore nei primi due giorni che coincide con il raggiungimento del picco di abbondanze cellulari. Quindi in questo esperimento il processo di germinazione si completa in 2 giorni, quando anche le attività metaboliche raggiungono i valori più elevati. L'attivazione implica una variazione della diversità della comunità microbica a breve termine come mostrato in appendice 1 dove si nota lo sviluppo dei *Delta-Proteobacteria*, e *Beta-proteobacteria* e *Firmicutes* (LGC), gruppi formanti spore ed in genere presenti in condizioni di reidratazione (Fazi *et al.*, 2005).

Scarsa è l'informazione su come eventi di siccità possano influenzare le attività degli enzimi extracellulari e quindi il flusso dei nutrienti dalla fase disciolta alla biomassa. Nella presente indagine le attività enzimatiche extracellulari testate (AMA e APA), coinvolte nel ciclo del C, N e P, mostrano attività rilevabili anche nel sedimento secco. Nei tempi successivi la reidratazione entrambi le attività enzimatiche mostrano una rapida riattivazione sebbene con modalità diverse. Entrambi le attività raggiungono il picco dopo quattro giorni dalla reidratazione ma mentre l'AMA mostra un incremento lineare l'APA rimane ferma su valori costanti nelle prime 12 ore. Questo meccanismo è probabilmente riconducibile a risultati ottenuti sperimentalmente dallo studio di sedimenti in progressivo essiccamento (Amalfitano *et al.*, 2008; Zoppini e Marxsen, 2011). Le comunità microbiche di questi sedimenti perdono progressivamente la capacità di produrre biomassa (PCP) e le cellule batteriche vive diminuiscono sensibilmente. Le attività enzimatiche extracellulari rimangono invece attive anche nei sedimenti secchi ed in particolar modo l'APA che non subisce cambiamenti significativi tra la condizione di bagnato e secco. Questo significa che il protrarsi dell'attività di fosfatasi libera nel mezzo circostante P inorganico che le cellule

non riescono ad assumere per via della progressiva inattivazione. Il sopraggiungere dell'acqua e la conseguente riattivazione del metabolismo richiede disponibilità di P ma non la riattivazione dell'enzima, essendo il P probabilmente in eccesso. Questo è un meccanismo molto importante con ripercussioni sulla circolazione dei nutrienti in condizioni di siccità, che sembra indipendente dall'azione metabolica delle cellule. Dai dati ottenuti dall'applicazione della tecnica di visualizzazione dell'attività di fosfatasi alcalina (ELF®97 fosfato), abbiamo potuto confermare la presenza di numerosi siti di attivazione per questo enzima, superiori numericamente al numero di cellule presenti nel sedimento secco. I siti attivi non sempre sono stati osservati associati alle cellule, risultando presenti anche liberi nella matrice (Sirová *et al.*, 2006). Questo meccanismo assicura probabilmente un migliore flusso di P nei sedimenti in cui le cellule sono stressate dalla siccità e in fase di quiescenza. Simili risultati sono stati osservati in sedimenti calcarei in cui il substrato è scarsamente disponibile per via dell'adsorbimento del P ai carbonati (Sirová *et al.*, 2006). La rapida riattivazione delle attività enzimatiche è stata anche descritta per i biofilm di fiumi temporanei (Romanì e Sabater 1997) reidratati dopo un periodo di siccità. Inoltre altri Autori hanno osservato come la riattivazione enzimatica avvenga in tempi diversi per il diverso genere di enzimi e come in generale l'AMA si riattivi prima degli altri (Marxsen *et al.*, 2010). La comunità batterica pur mostrando un rapido risveglio delle attività enzimatiche extracellulari testate non riesce a recuperare le velocità di idrolisi raggiunte negli studi di campo. Il massimo valore ottenuto per la fosfatasi alcalina si avvicina infatti ai valori misurati *in situ* nel sedimento secco ed umido nel mese di ottobre.

La disponibilità di fosforo inorganico permette la sintesi di ATP che avviene durante la fosforilazione ossidativa. L'attivazione, e la persistenza dell'attività extracellulare della fosfatasi alcalina, indica la limitazione di fosforo inorganico all'interno della cellula con conseguenze sulla fosforilazione ossidativa. Il ruolo chiave delle attività enzimatiche extracellulari come l'aminopeptidasi e la fosfatasi alcalina viene ulteriormente confermato dalle significative correlazioni osservate con l'abbondanza batterica ($r=0,62$, $p<0,001$ $n=31$; $r=0,61$, $p<0,001$ $n=31$).

4.5 Effetto e destino dei microinquinanti

Nel Progetto EU MIRAGE, alla prima fase di monitoraggio è seguita una seconda fase di attività svolta in laboratorio in cui si è voluto verificare la risposta delle caratteristiche funzionali e strutturali delle comunità microbiche residenti nel sedimento del fiume Celone

alla contaminazione da PAH in condizioni controllate. L'allestimento dei microcosmi contenenti sedimento e acqua, ha permesso di verificare l'effetto di una miscela di PAH aggiunta al sedimento in concentrazioni 10 e 100 volte più elevate rispetto al campione naturale. Le concentrazioni dei singoli composti nel sedimento non vengono significativamente modificate dalla presenza delle comunità microbiche naturali ad eccezione del fenantrene di cui, nei 28 giorni di incubazione, viene consumato il 50%, indipendentemente dal trattamento. Supponendo che la degradazione della molecola organica continui con la stessa velocità, si può stimare quindi che per la completa mineralizzazione del fenantrene siano necessari circa due mesi (57 giorni). Infatti nel sedimento trattato con la miscela di PAH a concentrazione 10 volte superiore a quella misurata in natura e sottoposto ad un incubazione prolungata di 300 giorni, è stata osservata una completa degradazione del fenantrene ed una riduzione della concentrazione di un secondo composto, il fluorantene. Il fenantrene, rispetto ai composti studiati, possiede una struttura molecolare con il più ridotto numero di anelli benzenici che lo rende più facilmente disponibile all'azione dei batteri. I meccanismi di biotrasformazione del fenantrene sono descritti in letteratura, dove si riporta anche una maggiore efficienza di mineralizzazione se i PAH sono presenti simultaneamente perché forniscono una maggiore risorsa di carbonio (Haritash e Kaushik, 2009). Questo meccanismo però non sembra essere altrettanto efficace quando la concentrazione delle sostanze è elevata, vedi l'inefficacia del trattamento 100X, anche se la degradazione potrebbe essere mascherata all'interno dell'errore analitico nella determinazione. Nell'analisi di questi risultati è, infatti, necessario anche considerare alcuni limiti dovuti sia alla scarsa solubilità di queste sostanze ad elevate concentrazioni sia alla difficoltà procedurale dell'analisi nei sedimenti. Questi limiti elevano la variabilità delle misure e riducono la significatività delle variazioni osservate.

I risultati hanno mostrato comunque come la maggioranza dei composti considerati rimanga inalterata nel sedimento per le quattro settimane, tempo programmato per l'interruzione dell'esperimento al fine di garantire la vitalità della comunità microbica in condizioni di laboratorio e di limitare lo sviluppo dei predatori. Nelle nostre indagini possiamo stimare come la mineralizzazione del fenantrene contribuisca per l'1% all'incremento giornaliero della PCP, così come osservato da altri Autori per PAH ritenuti substrati degradabili ma di scarsa appetibilità, quali il naftalene (Montgomery *et al.*, 2010). Elevate concentrazioni di PAH sono riportate in letteratura per i sedimenti di cinque ecosistemi costieri del Mediterraneo, le cui concentrazioni variano tra 62 e 2400 ng g⁻¹

(Fernandez *et al.*, 1999). Questi dati denotano una notevole diffusione di questi contaminanti anche in sedimenti di aree remote che lascia dedurre una contaminazione dovuta prevalentemente alla deposizione per via aerea. Inoltre i lunghi tempi di degradazione osservati sia nella nostra indagine che in letteratura (Fernandez *et al.*, 1999) lasciano dedurre che i sedimenti agiscono da recettori finali per questi inquinanti con un ruolo definito come *sink*.

L'arricchimento in substrato organico rappresentato dalla miscela di PAH aggiunta, induce scarse modificazioni delle abbondanze batteriche rispetto al controllo. Questi trattamenti inducono però significative modificazioni del metabolismo. Modificazioni del metabolismo di comunità microbiche del sedimento in seguito a contaminazione da PAH sono state riportate anche da Verrhiest *et al.*, (2002).

Come già descritto, la presenza di PAH induce un incremento lineare di PCP durante le prime due settimane di contatto stando ad indicare un progressivo utilizzo degli PAH per la sintesi di biomassa. Sebbene il trattamento 100X elevi la concentrazione di C disponibile alla comunità microbica rispetto al trattamento 10X, non si osservano tassi di produzione significativamente più elevati. Ciò potrebbe indicare che, oltre una certa soglia di concentrazione, la comunità batterica non riesce ad utilizzare questi inquinanti come fonte di carbonio. L'incremento di PCP osservato in seguito ai trattamenti non si osserva con le abbondanze cellulari. L'incremento dei soli tassi di incorporazione del C può essere giustificato dallo sviluppo delle specie batteriche in grado di utilizzare questi composti come substrato la cui crescita avverrebbe a svantaggio delle altre meno specializzate (Haritash e Kaushik, 2009). Il trattamento con PAH influenza infatti la diversità batterica come mostrato dal grafico riportato in appendice (3).

L'incremento dei tassi di PCP non si traduce quindi in una maggiore efficienza complessiva di produzione di biomassa come dimostra anche la diminuzione della concentrazione di ATP nel sedimento dei microcosmi trattati (Fig. 3.6). Dall'analisi di regressione si osserva una stretta relazione tra le variazioni della concentrazione di ATP e della respirazione (Fig. 3.8). Questi due parametri sono dipendenti tra loro, dato che il processo di respirazione è strettamente legato alla produzione di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa dell'ADP. Gli andamenti osservati tra queste variabili durante il periodo di incubazione descrive un andamento negativo che sta ad indicare un significativo disaccoppiamento osservato nei sedimenti trattati (10X, $p < 0,05$; 100X, $p < 0,01$) ma non nel controllo ($p > 0,05$). Il disaccoppiamento tra questi due parametri è stato osservato anche in comunità microbiche esposte ad interferenti endocrini (Günther *et al.*, 2001).

Il trattamento dei sedimenti con PAH determina un incremento significativo delle attività enzimatiche dell'aminopeptidasi rispetto al controllo ($p < 0,05$; $n=14$) ma nessuna modificazione dell'attività di fosfatasi. L'analisi del rapporto tra l'attività della fosfatasi alcalina e quella dell'aminopeptidasi dimostra valori pressoché costanti durante tutto il periodo sperimentale (media del rapporto = $2,97 \pm 0,61$), indicando nessuna variazione nella modalità di utilizzo delle risorse disponibili. Entrambe le attività enzimatiche extracellulari misurate non mostrano particolari inibizioni in seguito ai trattamenti con PAH ma una, seppur limitata, stimolazione rispetto al controllo. Gli inquinanti testati non modificano quindi, alle concentrazioni utilizzate, le attività di reperimento dei nutrienti delle cellule batteriche collocate esternamente alla parete cellulare. In letteratura è riportata una parziale inibizione dell'attività dell'aminopeptidasi per miscele di PAH somministrate in concentrazioni simili a quelle utilizzate in questa indagine (30 mg kg^{-1}) (Verrhiest *et al.*, 2002). La relazione che intercorre tra la presenza degli inquinanti ed il metabolismo microbico è ulteriormente dimostrata dalla relazione osservata, solo nei trattamenti, tra la variazione della concentrazione di ATP e l'attività di fosfatasi alcalina (Pearson $r = 0,71$; $p < 0,05$) che testimonia un attivo flusso di P che si genera tra l'attività di idrolisi e le cellule per la produzione di ATP ma che va diminuendo in quelle cellule in cui la fosforilazione è compromessa ($p > 0,05$).

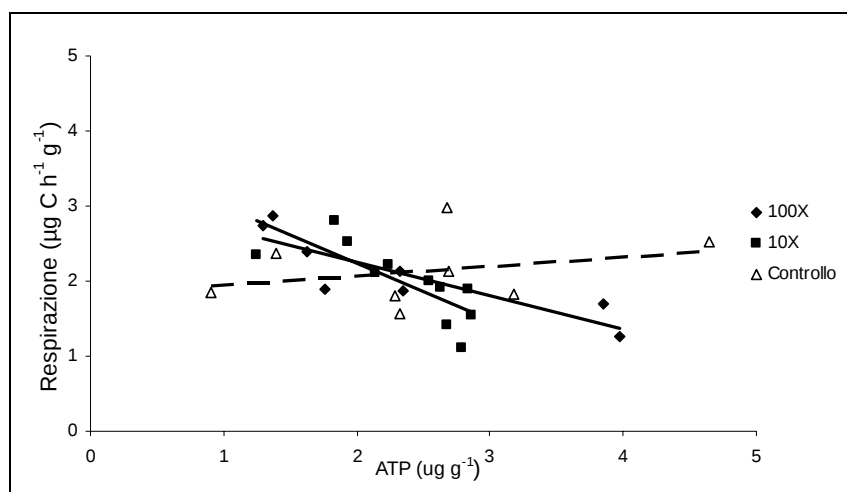


Figura 3.8 - Analisi di regressione tra la variazione della concentrazione di ATP e dei tassi di respirazione osservati durante il tempo di incubazione di sedimenti fluviali naturali (controllo) e trattati con concentrazioni crescenti di PAH (10X e 100X).

La capacità dei batteri di degradare i PAH ed utilizzarli come substrato di crescita è stata ampiamente studiata. L'induzione e la disattivazione degli enzimi ed i cambiamenti genetici sono alcuni dei meccanismi che la comunità microbica adotta in presenza di questi

contaminanti organici (Lachy e Colwell, 1990). La maggior parte delle ricerche scientifiche sono state effettuate isolando ceppi batterici da ecosistemi inquinati e sottoponendoli a test degradazione, selezionando come unica fonte di carbonio un singolo composto o una miscela di composti. Queste tipologie di studio non riflettono però la reale complessità della degradazione dei PAH nell'ambiente naturale.

Diversi studi sperimentali hanno individuato le numerose specie batteriche abili nella degradazione dei PAH (Cerniglia *et al.*, 1984; Samanta *et al.*, 2002). Le capacità di degradazione di queste specie fornisce interessanti prospettive a scopi di biorisanamento, la cui ottimizzazione prevede anche lo sfruttamento di alcune caratteristiche delle specie batteriche selezionate come la chemiotassi (Samanta *et al.*, 2002).

Appendice 3 - Effetti degli IPA sulla diversità della comunità microbica

Nel corso di questa sperimentazione sono state condotte parallelamente indagini sulla diversità della comunità microbica effettuata con indagini molecolari (metodo CARD-FISH).

L'analisi della composizione della comunità microbica ha evidenziato la prevalente presenza degli *Alpha-Proteobacteria* (Alpha) e *Beta-Proteobacteria* (Beta) sugli altri gruppi analizzati, senza rilevare alcuna differenza significativa tra i trattamenti ed il controllo (Fig. 3.9).

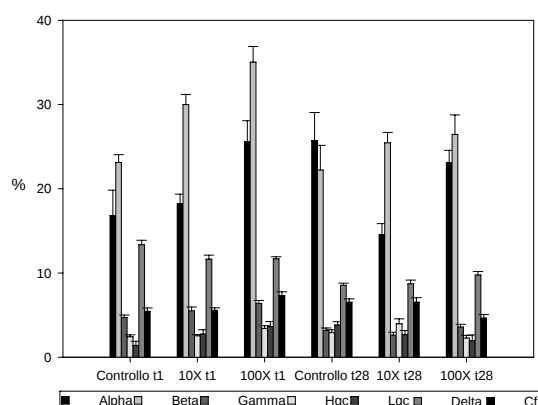


Figura 3.9 - Struttura delle comunità nei tre trattamenti al tempo 1 e al tempo 28 giorni.

Solamente dopo una prolungata esposizione (300 giorni) della comunità batterica agli PAH (IPA10X) è stato osservato un cambiamento nella struttura della comunità con un andamento decrescente di tutti i gruppi considerati ad eccezione dei *Delta-Proteobacteria*, che invece tendono ad aumentare (test t di Student = -13,2 P = 0,006). Questo gruppo risulta essere coinvolto nella degradazione dei PAH in sedimenti anossici (Hayes e Lovley, 2002). Inoltre, Smith e Kiara (2010) studiando la degradazione anaerobica di PAH a basso peso molecolare in sedimenti argillosi, hanno osservato una dominanza dei *Delta-Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Acteriodetes*. Solamente dopo una prolungata esposizione della popolazione batterica nel trattamento PAH 10X è stato osservato un cambiamento nella struttura della comunità con un andamento decrescente di tutti i gruppi considerati ad eccezione dei *Delta-Proteobacteria*, che invece tendono ad aumentare (test t di Student = -13,2 P = 0,006). Questo gruppo risulta essere coinvolto nella degradazione dei PAH in sedimenti anossici (Hayes e Lovley, 2002). Inoltre, Smith e Kiara (2010) studiando la degradazione anaerobica dei PAH a basso peso molecolare in sedimenti argillosi, hanno osservato una dominanza dei *Delta-Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteriodetes*.

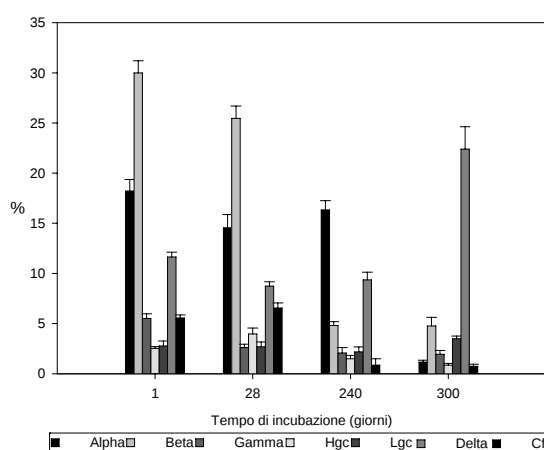


Figura 3.10 - Struttura delle comunità nel trattamento 10X al tempo 1, 28, 240 e 300 giorni

5. CONCLUSIONI

I cambiamenti climatici rendono indispensabile lo sviluppo delle conoscenze scientifiche in tutti gli aspetti connessi con la gestione delle risorse idriche. Sebbene le conoscenze sui sistemi fluviali siano migliorate in questi ultimi 40 anni, rimangono ancora delle lacune soprattutto nello sforzo di rendere fruibili le conoscenze scientifiche agli Amministratori al fine di proteggere e risanare le risorse idriche. Questo vale in modo particolare per i sistemi sottoposti ad un regime idrico temporaneo le cui dinamiche non seguono andamenti regolari.

In seguito ai cambiamenti climatici si prevedono modificazioni nella frequenza e distribuzione delle piogge che andranno a influenzare il ciclo idrologico (Milly *et al.*, 2005). Tali modificazioni andranno ovviamente ad interferire in maniera più importante nei cicli idrologici delle acque temporanee dove le drastiche e rapide variazioni dei flussi idrici, che già rendono questi sistemi molto fragili, andranno ad estremizzarsi. In questo scenario i fiumi temporanei subiranno modifiche significative della frequenza e della durata delle fasi di aridità e di inondazione. Le attività microbiche del sedimento si adattano rapidamente alle drastiche variazioni ambientali dei fiumi temporanei, rispondendo prontamente alla variazione delle risorse e influenzando significativamente il flusso di C dal sedimento alla biomassa (Zoppini *et al.*, 2010). Da recenti indagini sperimentali si è inoltre venuti a conoscenza di una significativa alterazione delle proprietà metaboliche delle comunità microbiche durante la progressiva disidratazione del sedimento nel periodo di siccità (Amalfitano *et al.*, 1998). I periodi di siccità quindi rappresentano un momento di criticità per l'ecosistema in quanto il C viene accumulato piuttosto che mineralizzato. Le piogge successive, in genere improvvise e violente provocano elevati picchi di flusso in seguito ai quali il sedimento è soggetto a dilavamento e la sostanza organica viene rilasciata e trasportata nei bacini idrici posti a valle (laghi, invasi, aeree costiere).

I sistemi fluviali, in stretto contatto con l'ecosistema terrestre, trasportano elevati carichi di sostanza organica sia di origine terrigena che di origine antropica. Il destino stesso di queste sostanze e la riduzione dell'effetto tossico è strettamente legato alla trasformazione operata dalle comunità microbiche. Nella presente indagine si è osservato come il sedimento di un tratto poco antropizzato risulti contaminato da PAH e come in condizioni controllate le comunità microbiche si siano dimostrate scarsamente abili nella loro degradazione. Il contatto con queste sostanze ha anche causato evidenti danni metabolici alle comunità microbiche che possono ripercuotersi sulla catena trofica

interrompendo il normale flusso di C dalla fase disciolta alla biomassa. Da questo andamento si può dedurre un impatto consistente sull'ecosistema dove questi inquinanti, inseriti nella lista delle sostanze prioritarie dalla Comunità Europea, hanno un tempo di permanenza molto lungo se si considera che l'unico composto degradabile necessita di oltre 2 mesi per essere completamente degradato. Il contatto prolungato con questi microinquinanti organici, oltre ad influire sulla mineralizzazione della sostanza organica di ogni tipo ed origine, può creare fenomeni di tossicità nei confronti di tutti gli organismi che colonizzano il sedimento, tra cui crostacei, molluschi bivalvi e la componente autotrofa (Haritash e Kaushik, 2009). I lunghi tempi di permanenza nell'ambiente che caratterizzano i PAH comportano anche la contaminazione di riserve idriche ad uso potabile generalmente poste a chiusura dei corsi d'acqua temporanei.

In conclusione, le informazioni raccolte nella presente indagine forniscono indicazioni sulla modificazione dei flussi di carbonio in funzione delle diverse condizioni ambientali includenti la presenza di inquinanti. Gli Amministratori, al fine della corretta gestione delle risorse idriche, hanno necessità di elevati livelli di certezze scientifiche prima di trarre sostegno dalle informazioni sperimentali. I risultati di questa indagine rappresentano quindi un tassello dell'informazione necessaria alla gestione di questi ecosistemi fragili dal punto di vista ecologico, ancora oggi scarsamente descritti ma ampiamente diffusi nell'area mediterranea e sempre più sfruttati per far fronte all'incremento del fabbisogno idrico.

BIBLIOGRAFIA

Ademollo N., Capri S., Froebrich J., Patrolecco L., Polesello S., Puddu A., Rusconi M., Valsecchi S. (2011). Fate and monitoring of hazardous substances in temporary rivers. *Trends Anal. Chem.*, 30(8): 1222-1232.

Ahel M., Giger W., Schaffner C. (1994). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment-2. Occurrence and transformation in rivers. *Water Res.*, 28:1143–1152.

Algesten G., Sobekw S., Bergström A. K., Agren A., Tranvik L. J., Jansson M. (2004). Role of lakes for organic carbon cycling in the boreal zone. *Glob. Change Biol.*, 10: 141-147.

Amalfitano S. (2007). Structure and function of benthic microbial community in highly variable freshwater system. *Doctorate Thesis, Università di Roma Tor Vergata, IRSA-CNR*,124; http://art.torvergata.it/bitstream/2108/576/1/Amalfitano_Tesi_Dottorato_16-04-2007.pdf.

Amalfitano S., Fazi S., Zoppini A., Barra Carracciolo A., Grenni P., Puddu A. (2008). Responses of benthic bacteria to experimental drying in sediments from Mediterranean temporary rivers. *Microb. Ecol.*, 55: 270-279.

Amalfitano S., Fazi S., Zoppini A., Puddu A. (2009). Quantificazione delle cellule batteriche associate a sedimento fluviale mediante microscopia ad epifluorescenza e citometria a flusso. *Notiziario dei metodi analitici, Suppl. Quaderni, IRSA-CNR Roma*, 2(1): 19-23.

APAT e IRSA-CNR (2003). Idrocarburi policiclici aromatici. In: Metodi analitici per le Acque. *Manuali e linee guida, APAT, rapporti 29/2003*,2: 697-705.

Artigas J., Romaní A. M., Sabater S. (2008). Relating nutrient molar ratios of microbial attached communities to organic matter utilization in a forested stream. *Archiv für Hydrobiologie*, 173:255-264.

Armanini D. G., Buffagni A., Cazzola M., Erba S., Portoghese I., Di Modugno M., D'Agostino D. R. (2008). Stato ecologico dei corsi d'acqua affluenti al Candelaro e delle fasce ripariali e zone umide disposte in prossimità del reticolo idrografico. In: *Definizione di strategie sostenibili per la gestione di bacini idrografici in aree semiaride. IRSA-CNR, Quaderni*, 128: 39-90.

Arnold J. G., Srinivasan R., Muttiah R. S., Williams J. R. (1998). Large area hydrologic modeling and assessment – Part 1: model development. *J. Am. Wat. Res. Assoc.*, 34 (1): 73–89.

Atlas R. M., Bartha R. (1998). Development of microbial Communities. In: *Microbial Ecology. R.M. Atlas and R. Bartha Eds. Menlo Park*, 179-181.

Austin A. T., Yahdjian L., Stark J. M., Belnap J., Porporato A., Norton U., Ravetta D. A., Schaeffer S. M. (2004). Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia*, 141: 221–235.

Azam F., Fenchel T., Field J. G., Gray J. S., Meyer-Reil L. A., Thingstad F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10: 257-263.

Azam F., Smith D. C., Steward G. F., Hagstrom A. (1993). Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microb. Ecol.*, 28: 167-179.

Baldwin D. (1996). Structural Characterisation of Aquatic Phosphorus in Nutrient Determination in Freshwaters. *K. Robbards and S. Helliwell (eds) Land and Water Resources Research and Development Corporation Occasional Paper 08/95. ISBN 0 642 20624 4.*

Baldwin D. S., Mitchell A. M. (2000). The effects of drying and re-flooding on the sediment and soil nutrient dynamics of lowland river-floodplain systems: a synthesis. *Regul. Rivers: Res. Mgmt.*, 16: 457–467.

Barca E., Passarella G., Lo Presti R., Masciale R., Vurro M. (2006). Candelaro River Catchment Data Report. *HarmoniRiB River Basin Data Documentation Candelaro River Basin*, 7: 9-13.

Barra R., Quiroz R., Saez K., Araneda A., Urrutia R., Popp P. (2009). Sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of the Biobio River in south central Chile. *Environ. Chem. Letters.*, 7: 133-139.

Belain R. M., Sinclair J. L., Ghiorse W. C. (1998). Distribution and activity of microorganism in subsurface sediments of a pristine study site in Oklahoma. *Microb. Ecol.*, 16: 85-97.

Belnap J., Welter J. R., Grimm N. B., Barger N., Ludwig J. A. (2005). Linkages between microbial and hydrologic processes in arid and semiarid. *Ecology*, 86(2): 298–307.

Bell R. T. (1993). Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine. In: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Kemp P. F., Sherr B. F., Sherr E. B., Cole J. J. Eds. Lewis Publishers, Boca Raton, 58: 495-503.

Benke A. C., Van Arsdall T. C. Jr., Gillespie D. M., Parrish F. K. (1984). Invertebrate productivity in a subtropical blackwater river. The importance of habitat and life history. *Ecol. Monog.*, 54: 25-63.

Benner R. (2002). Chemical composition and reactivity. In: *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. D.A. Hansell & C.A. Carlson Eds. Academic Press, New York., 59-90.

Bernal S., Butturini A., Sabater F. (2002). Variability of DOC and nitrate responses to storms in a small Mediterranean forested catchment. *Hydrol. Earth Syst. Sc.*, 6(6): 1031-1041.

- Bernal S., Butturini A., Nin E., Sabater S., Sabater F.** (2003). Leaf litter dynamics and Nitrous Oxide Emission in a Mediterranean riparian forest: implications for soil nitrogen dynamics. *J. Environ. Qual.*, 32(1): 191-197.
- Billi D., Potts M.** (2002). Life and death of dried prokaryotes. *Res. Microbiol.*, 153(1): 7 – 12.
- Blenkinsopp S. A., Lock M. A.** (1990). The measurement of electron transport system activity in river biofilms. *Wat. Res.*, 24(4): 441-445.
- Bloem J., Veninga M., Sheperd J.** (1995). Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes, and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:926–936.
- Buesing N., Gessner M. O.** (2003). Incorporation of radiolabeled leucine into protein to estimate bacterial production in plant litter sediment epiphytic biofilms and water samples. *Microb. Ecol.*, 45: 291–301.
- Burns A., Ryder D. S.** (2001). Response of bacterial extracellular enzymes to inundation of floodplain sediments. *Freshwat. Biol.*, 46:1299–1307.
- Caldeira K., Akai M.** (2005). Ocean storage. In: *Intergovernmental Panel on Climate Change special report on carbon dioxide capture and storage*. H. C. Coninck, Loos, B. Metz, O. Davidson, L. A. Meyer Eds. *Cambridge University Press, Cambridge*, 277-317.
- Canadian Council of Ministers of the Environment, (CCME)** (1999). Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). In: *Canadian Environmental Quality Guidelines*. Winnipeg, Manitoba, 16.
- Cerniglia C. E.** (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.*, 30: 31–71.
- CIS** (Camford Information Services) (2005). CPI Product Profiles. Polyaromatic Hydrocarbons (PAH s).
- Cherrier J., Bauer J. E., Druffel E. R. M., Coffin R. B., Chanton J. P.** (1999). Radiocarbon in marine bacteria: evidence for the ages of assimilated carbon. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 730-736.
- Choy B., Reible D. D., Valsaraj K. T.** (2001). Contaminant Transport in Soils and Sediments. *Environ. Eng. Sci.*, 18: 279.
- Cole J. J., Prairie Y. T., Caraco N. F., McDowell W. H., Tranvik L. J., Strigl R. G., Duarte C. M., Kortelainen P., Downing J. A., Middelburg J. J., Melack J.** (2007). Plumbing the global carbon cycle: integrating inland water into the terrestrial carbon budget. *Ecosystems*, 10: 171-184.
- Cole J. J., Caraco N. F.** (2001). Carbon in catchments: connecting terrestrial carbon losses with aquatic metabolism. *Mar. Freshwater. Res.*, 52: 101–10.

- Coolen M. J. L., Overmann J.** (2000). Functional exoenzymes as indicators of metabolically active bacteria in 124,000-years-old sapropel layers of the eastern Mediterranean sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2589-2598.
- Corvini P. F. X., Vinken R., Hommes G., Schmidt B., Dohmann M.** (2004). Degradation of the radioactive and non-labelled branched 3',5'-dimethyl 3'-heptyl-phenol nonylphenol isomer by *Sphingomonas* TTNP3. *Biodegradation*, 15:9–18.
- Corvini P. F. X., Schäffer A., Schlosser D.** (2006). Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols—our evolving view. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72:223–243.
- Courtois S., Frostegard A., Goransson P., Depret G., Jeannin P., Simonet P.** (2001). Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ. Microbiol.*, 3: 431-439.
- Chrost R. J.** (1990). Microbial ectoenzymes in aquatic environments. In: *Aquatic Microbial Ecology: Biochemical and molecular approaches*. Brock/Springer, N.Y., 47-78.
- Cummins K. W., Klug M. J.** (1979). Feeding ecology of stream invertebrates. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 10: 147-172.
- Dagley S.** (1971). Catabolism of aromatic compounds by microorganism. *Adv. Microb. Physiol.*, 6: 1-6.
- Dahm C. N., Baker M. A., Moore D. I., Thibault J. R.** (2003). Coupled biogeochemical and hydrological responses of streams and rivers to drought. *Freshwater Biol.*, 48: 1219-1231.
- Daims H., Wagner M.** (2007). Quantification of uncultured microorganism by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75: 237-248.
- Darrel J. G., Lal R.** (2005). Hydrologic sources of carbon cycling uncertainty throughout the terrestrial-aquatic continuum. *Glob. Chang. Biol.*, 11: 1873–1882.
- De Vries Y. P., Takahara Y., Ikunaga Y., Ushiba Y., Hasegawa M., Kasahara Y., Shimomura H., Hayashi S., Hirai Y., Ohta H.** (2001). Organic nutrient-dependent degradation of branched nonylphenol by *Sphingomonas* sp. YT isolated from a river sediment sample. *Microbes Environ.*, 16:240–249.
- Decreto** 16 giugno 2008, n. 131: Regolamento recante i criteri tecnici per la caratterizzazione dei corpi idrici (tipizzazione, individuazione dei corpi idrici, analisi delle pressioni) per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152. *Supplemento Ordinario n. 189 alla Gazzetta Ufficiale n. 187 dell'11 agosto 2008*.
- De Groot C. J., Van Wijck C.** (1993). The impact of desiccation of a freshwater marsh (Garcines Nord, Camargue, France) on sediment-water-vegetation interactions. *Hydrobiologia*, 252:83-94.

Del Giorgio P. A., Scarborough G. (1995). Increases in the proportion of metabolically active bacteria along gradients of enrichment in freshwater and marine plankton: Implications for estimates of bacterial growth and production rates. *J. Plank. Res.*, 17: 1905-1924.

Del Giorgio P. A., Gasol J. M., Vaque D., Mura P., Agusti S., Duarte C. M. (1996). Bacterioplankton community structure: Protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. *Limnol. Oceanogr.*, 41: 1169-1179.

Del Giorgio P. A., Cole J. J. (2000). Bacterial energetics and growth efficiency. *Mar. Microb. Ecol.*, 289-325.

Del Giorgio P. A., Williams P. J. (2005). The global significance of respiration in aquatic ecosystem: from single cell to the biosphere. In: *Respiration in aquatic ecosystem*, Del Giorgio P.A. and Williams P. J. Eds., Oxford University Press Inc., NY, 315.

De Nobili M., Contin M., Brookes P. C. (2006). Microbial biomass dynamics in recently air-dried and rewetted soils compared to others stored air-dry for up to 103 years. *Soil Biol Biochem.*, 38: 2871-2881.

Direttiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque. L. 348/84 IT, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea 24.12.2008.

Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. L 327/1 IT Gazzetta ufficiale delle Comunità europee 22.12.2000.

Döring M. (2007). Environmental heterogeneity and respiration in a dynamic river corridor: structural properties and functional performance. *PhD Dissertation, University of Zurich, ETH No. 17046, pp. 1-137.*

Ducklow H. W. (2000). Bacterial production and biomass in the oceans. In: *Microbial Ecology of the Oceans*, Kirchman D. L. Ed., John Wiley and Sons, New York.

European Union Risk Assessment Report (2000). 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol. Institute for Health and Consumer Protection European Chemicals Bureau, Existing Substances, 2nd Priority List, 10.

EEA (European Environment Agency) (2008). Impacts of Europe's changing climate - indicator-based assessment. *EEA Report No 4.*

Etherington J. R. (1983). Wetland Ecology. *Edward Arnold, London*, 67.

Fazi S., Amalfitano S., Pernthaler J., Puddu A. (2005). Bacterial communities associated with benthic organic matter in headwater stream microhabitats. *Environ. Microb.*, 7(10): 1633-1640.

Fazi S., Amalfitano S., Pizzetti I., Pernthaler J. (2007). Efficiency of fluorescence *in situ* hybridization for bacterial cell identification in temporary river sediments with contrasting water content. *Syst. Appl. Microbiol.*, 30: 463-470.

- Fazi S.**, Amalfitano S., Piccini C., Zoppini A., Puddu A., Pernthaler J. (2008). Colonization of the overlying water by bacteria from dry river sediment. *Environ. Microb.*, 10(0): 2760-2772.
- Fernandez P.**, Grifoll A. M., Solanas A. M., Bayona J. M., Albaiges J. (1992). Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 26: 817-829.
- Fernandez P.**, Vilanova R. M. e Grimalt J. O. (1999). Sediment Fluxes of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in European High Altitude Mountain Lakes. *Environ. Sci. Technol.*, 33: 3716-3722.
- Fierer N.**, Schimel J. P., Holden P. A. (2003). Influence of dryin-rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microb. Ecol.*, 45: 63-71.
- Findlay S.**, Tank J., Dye S., Valett H. M., Mulholland P. J., McDowell W. H. (2002). A cross-system comparison of bacterial and fungal biomass in detritus pools of headwater streams. *Microb. Ecol.*, 43: 55-66.
- Fischer H., Pusch M.** (2001). Comparison of bacterial production in sediments, epiphyton and the pelagic zone of a lowland river. *Freshw. Biol.*, 46: 1335-1348.
- Fischer H.**, Susanne C., Pusch W., Pusch M. (2002). Bacterial abundance and production in river sediments as related to the biochemical composition of particulate organic matter (POM). *Biogeochemistry* 61: 37–55.
- Fonnesu A.**, Deiana A. M., Basset A. (2004). Effetti della siccità sull'abbondanza e distribuzione dei macroinvertebrati. *Rendiconti Seminario Facoltà Scienze Università Cagliari* 75: Fasc. 1-2.
- Fleituch T.**, Starzecka A., Bednarz T. (2001). Spatial trends in sediment structure, bacteria and periphyton communities across a freshwater ecotone. *Hydrobiologia*, 464: 165-174.
- Frissel C. A.**, Wiss W. J., Warren C. E., Huxley M. D. (1986). A hierarchical framework for stream classification: viewing streams in a watershed context. *Environ. Manag.*, 10: 199-214.
- Fujii K.**, Urano N., Ushio H., Satomi M., Kimura S. (2001). *Sphingomonas cloacae* sp. Nov., a nonylphenol-degrading bacterium isolated from wastewater of a sewage-treatment plant in Tokyo. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 51:603–610.
- Gerakis A., Baer B.** (1999). A computer program for soil textural classification. http://nowlin.css.msu.edu/software/triangle_form.html/. *Soil Sci Soc Am J.*, 63: 807–808.
- Gilichinsky D. A.**, Vorobyova E. A., Erokhina L. G., Fyodorov-Dayvdov D. G., Chaikovskaya N. R. (1992). Long-term preservation of microbial ecosystem in permafrost. *Adv. Space Res.*, 12: 255-263.
- Giorgi F.**, (2006). Climate change Hot-spots. *Geophys. Res. Lett.*, 33.

- Goldman J. C.**, Caron D. A., Dennett M. R. (1987). Regulation of Gross Growth Efficiency and Ammonium Regeneration in Bacteria by Substrate C:N Ratio. *Limnol. Oceanogr.*, 32(6): 1239-1252.
- Grace J.** (2004). Understanding and managing the global carbon cycle. *J. Ecol.*, 92: 189-202.
- Gregory J. M.**, Mitchell J. F. B., Brady A. J. (1997). Summer drought in northern mid-latitudes in a time-dependent CO₂ climate experiment. *J. Climate*, 10: 662-686.
- Grubaugh J. W., Anderson R. V.** (1989). Upper Mississippi River: Seasonal and floodplain forest influences on organic matter transport. *Hydrobiologia*, 174: 235-244.
- Günther K.**, Dürbeck H. W., Kleist E., Thiele B., Prast H., Schwuger M. (2001). Endocrine-disrupting nonylphenols – ultra-trace analysis and time-dependent trend in mussels from the German bight. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371 :782–786.
- Guo W.**, He M., Yang Z., Lin C., Quan X., Wang H. (2007). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River watershed, China. *Chemosphere*, 68: 93-104.
- Hall R. O., Meyer J. L.** (1998). The trophic significance of bacteria in a detritus-based stream foodweb. *Ecology*, 79: 1995–2012.
- Halverson L. J.**, Jones T. M., Firestone M. K. (2000). Release of intracellular solutes by four soil bacteria exposed to dilution stress. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64: 1630-1637.
- Haritash A. K., Kaushik C. P.** (2009). Biodegradation aspect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs): A review. *J. Hazard. Mater.*, 169: 1-15.
- Hayes L. A., Lovley D. R.** (2002). Specific 16S rDNA sequences associated with naphthalene degradation under sulfate- reducing conditions in harbor sediments. *Microb. Ecol.*, 43: 134–145.
- Heyer C., Kalfs J.** (1998). Organic matter mineralization rates in sediments: A within- and among-lake study. *Limnol. Oceanogr.*, 43(4):695-705.
- Hill B. H., Gardner T. J.** (1987). Benthic metabolism in a perennial and an intermittent Texas prairie stream. *Southwestern Nat.*, 32: 305-311.
- Hill B. H.**, Hall R. K., Husby P., Herlihy A. T., Dunna M. (2000). Interregional comparisons of sediment microbial respiration in streams. *Freshwater. Biol.*, 44: 213-222.
- Hinga K. R.** (1980). The fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in Enclosed Marine Ecosystems. *Ph.D. Thesis, University of Rhode Island Graduate School of Oceanography, Narragansett, RI.*
- Holmes R.**, Fischer S. G., Grimm N. B., Harper B. J. (1998). The impact of flash flood on microbial distribution and biogeochemistry in the parafluvial zone of a desert stream. *Freshwater. Biol.*, 40: 641-654.

Holm-Hansen O., Booth C. R. (1966). The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnol. Oceanogr.*, 11: 510-519.

Hooke J., Mant J. (2002). Morpho-dynamics of Ephemeral stream. *Dryland Rivers – Hydrology and Geomorphology of Semi-Arid Channels*, L. J. Bull and M. J. Kirkby Eds., 6: 173-186.

Hoppe H. G. (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurement by means of methylumbiliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 11: 299-308.

Hoppe H. G. (1991). Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer-Verlag, 60-83.

Hoppe H. G. (1993). Use of fluorogenic model substrate for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria. In: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publisher, Boca Raton FL, 423-432.

Hoppe H. G., Arnosti C., Herndl G. J. (2002). Ecological significance of bacterial enzyme in the marine environment. In: *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*, Burns R., Dick R. Eds., Marcel Dekker, New York, 73-108.

Hoppe H. G. (2003). Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia*, 493: 187–200.

Huntington G. T. (2006). Evidence for intensification of the global water cycle: Review and synthesis. *J. Hydrol.*, 319: 83-95.

Huntjens P., Pahl-Wostl C., Grin J. (2010). Climate change adaptation in European river basins. *Reg. Environ. Change.*, 10:263–284.

<http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/metabolism.html>

Hynes H. B. N. (1970). The ecology of Runnig Waters. *Toronto, University of Toronto press*.

IARC (1983-1985). The evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *IARC. Monographs. Lyon, France*, 32-35.

IPCC (2007). Climate Change 2007: The Physical Science Basis - Summary for Policymakers. *IPCC Secretariat, Geneva (CH)*, 1-18.

Jacobson P. J., Jacobson K. M., Angermeier P. L., Cherry A. S. (2000). Variation in material transport and water chemistry along a large ephemeral river in Namibia Desert. *Freshw. Biol.*, 44: 481-491.

Jiao N., Herndl G. J., Hansell D. A., Benner R., Kattner G., Wilhelm S. W., Kirchman D. L., Weinbauer M. G., Luo T., Chen F. and Azam F. (2010). Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat. Rev., Microbiol.*, 8: 593-599.

- Jenkinson D. S.** (1988). The determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil. In: *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems*. Wilson, J.R. Ed., Commonwealth Bureau International, Wallingford, 368-386.
- John D. M.,** House W. A., White G. F. (2000). Environmental fate of nonylphenol ethoxylates: Differential adsorption of homologs to components of river sediment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19:293–300.
- Jones J. B., Smock L. A.** (1991). Transport and retention of particulate organic matter in two low-gradient headwater streams. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 10: 115-126.
- Jones J. B.,** Fischer S. G., Grimm N. B. (1995). Vertical hydrological exchange and ecosystem metabolism in a Sonoran Desert stream. *Ecol.*, 76:942–952.
- Jones J. G., Simon B. M.** (1979). The measurement of electron transport system activity in freshwater benthic and planktonic samples. *J. Appl. Bacteriol.*, 46: 305-3 15.
- Jugnia L. B.,** Richardot M., Debroas D., Sime-Ngando T. S., Devaux J. (2000). Variations in the number of active bacteria in the euphotic zone of a recently flooded reservoir. *Aquat. Microb. Ecol.*, 22: 251–259.
- Kaarik A. A.** (1974). Decomposition of wood”. *Biology of Plant Litter Decomposition*. C.H. Dickinson and G.J.F. Pugh Eds., Vol. I, Academic Press, New York; 129-174.
- Kapuscinski (1995).** DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech. Histochem.*, 70: 220 –233.
- Karl D. M., La Rock P. A.** (1975). Adenosine triphosphate measurement in soil and marine sediments. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 32: 599-607.
- Karl D. M., Craven D. B.** (1980). Effects of alkaline phosphatase activity on nucleotide measurements in aquatic microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 549-561.
- Karl D. M.** (1980). Cellular Nucleotide Measurement and Applications in Microbial Ecology. *Microbiol. Rev.*, 739-796.
- Katayama A.,** Kai K., Fujie K. (1998). Extraction efficiency, size distribution, colony formation and ³H-thymidine incorporation of bacteria directly extracted from soil. *Soil Sci. Plant. Nutr.*, 44: 245-252.
- Kirchman D. L.** (1993). Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria. In: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Kemp P. F., Sherr B. F., Sherr E. B., Cole J. J. Eds., Lewis Publishers, Boca Raton, 58: 509-512.
- Kirchman D. L.** (1993). Statistical Analysis of Direct Counts of Microbial Abundance. In: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Kemp P. F., Sherr B. F., Sherr E. B., Cole J. J. Eds., Lewis Publishers, Boca Raton, 14: 117-119..
- Kirchman D. L.** (2001). Measuring bacterial biomass production and growth rates from leucine incorporation in natural aquatic environments. In: *Marine Microbiology. Methods in Microbiology* 30, Paul J. H. Ed., Academic Press, San Diego, 12: 227-237.

Krauss M., Wilcke W. (2002). Photochemical oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in soils – a tool to assess their degradability? *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 165: 173-178.

Laehy J.G. Colwell R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 54(3): 305-315.

Lake P. S. (2003). Ecological effects of perturbation by drought in flowing waters. *Freshwater Biol.*, 48: 1161-1172.

Larned S. T., Datry T., Robinson C. T. (2007). Invertebrate and microbial responses to inundation in an ephemeral river reach in New Zealand: effects of preceding dry periods. *Aquat. Sci.*, 2-14.

Lee S., Fuhrman J. A. (1987). Relationship between biovolume and biomass of naturally derived bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1298-1303.

Lin L. L., Janz D. M., (2006) Effects of binary mixtures of xenoestrogens on gonadal development and reproduction in zebrafish. *Aquat. Toxicol.*, 80:382-395.

Lindahl V. (1996). Improved soil dispersion procedures for total bacterial counts, extraction of indigenous bacteria and cell survival. *J. Microbiol. Methods.*, 25: 279-286.

Logue J. B., Robinson C. T., Meier C., Van der Meer J. R. (2004). Relationship between sediment organic matter, bacterial composition and the ecosystem metabolism of alpine streams. *Limnol. Oceanogr.*, 49: 2001-2010.

Lorenc J. F., Lambeth G., Scheffer W. (1992). Alkylphenols. In: *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, J.I. Kroschwitz and M. Howe-Grant (eds.), 4th ed. John Wiley and Sons, New York., 2: 113-143.

Lo Porto A., De Girolamo A. M., Santese G. (2010). Use of a watershed model in the development of a River Basin Management Plan in a catchment with limited data. *21st Century Watershed Technology: Improving Water Quality and Environment CD-Rom Proceedings, 21-24 February 2010 (Universidad EARTH, Costa Rica)*.

Lu J., Yiliang H., Wu J., Jin Q. (2009). Aerobic and anaerobic biodegradation of nonylphenol ethoxylates in estuary sediment of Yangtze River, China. *Environ. Geol.*, 57:1-8.

Luna G. M., Manini E., Danovaro R. (2002). Large fraction of dead and inactive bacteria in coastal marine sediments: comparison of protocols for determination and ecological significance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 3509-3513.

Luo X. J., Chen S. J., Mai B. X., Yang Q. S., Sheng G. Y., Fu J. M. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter and sediments from the Pearl River Estuary and adjacent coastal areas, China. *Environmen. Pollut.*, 139: 9-20.

Lydell C., Dowell L., Sikaroodi M., Gillevet P., Emerson D. (2004). A population survey of members of the phylum Bacteroidetes isolated from salt marsh sediments along the East coast of the United States. *Microb. Ecol.*, 48: 263-273.

- McMahon T. A., B. L.** (2003). Droughts and anti-droughts: the low flow hydrology of Australian rivers. *Freshwater. Biol.*, 48:1147–1160.
- Marxsen J.**, Zoppini A., Wilczek S. (2010). Microbial communities in streambed sediments recovering from desiccation. *FEMS Microb. Ecol.*, 71: 374–386.
- Massana R.**, Josep M., Gasol M., Peter K. Bjørnsen, Blackburn N., Hagstrom A., Hietanen S., Hyguma B. H., Kuparinen J., Pedròs-Alios C. (1997). *Sci. Mar.*, 61(3): 397-407.
- Mazzera D.**, Hayesb T., Lowenthala D., Zielinskab B. (1999). Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil at McMurdo Station, Antarctica. *Sc. Tot. Environ.*, 229 (1-2): 65-71.
- McClain N. J.**, Boyer E., Dent L., Gergel S., Grimm N., Groffman P., Hart S., Harvey J., Johnston C., Mayorga E., McDowell W., Pinay G. (2003). Biogeochemical hot spots and hot moments at the interface of terrestrial and aquatic ecosystems. *Ecosystems*, 6: 301-312.
- McDonald S. J.**, Kennicutt M. C., Brooks J. M. (1992). Evidence of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in fish from the Antarctic peninsula. *Mar. Pollut. Bull.*, 25: 313-317.
- McMahon T. A., Finlayson B. L.** (2003). Droughts and anti-droughts: the low flow hydrology of Australian rivers. *Freshwat. Biol.*, 48(7):1147–1160.
- Meyer J. L.** (2005). Heterogeneity and ecosystem function: Enhancing ecological understanding and applications. In: G. M. Lovett, C. G. Jones, M. G. Turner, and K. C. Weathers, editors. *Ecosystem function in heterogeneous landscapes*. Springer, New York.
- Milly P. C. D.**, Dunne K. A., Vecchia A. V. (2005). Global pattern of trends in streamflow and water availability in a changing climate. *Nature.*, 438: 347-350.
- Monk C. D.** (1976). The distribution of cellulose in freshwater invertebrates of different feeding habitats. *Freshwat. Biol.*, 6: 471-475.
- Montgomery-Brown J.**, Reinhard M. (2003). Occurrence and Behavior of Alkylphenol Polyethoxylates in the Environment. *Environ. Eng. Sci.*, 20(5): 471-486.
- Montgomery M. T.**, Boyd T. J., Osburn C. L., Smith D. C (2010). PAH mineralization and bacterial organotolerance in surface sediment of the Charleston Harbor estuary. *Biodegradation*, 21: 257-266.
- Mulholland P. J.**, Fellows C. S., Tank J. L., Grimm N. B. (2001). Inter-biome comparison of factors controlling stream metabolism. *Freshwater. Biol.*, 46: 1503-1517.
- Mulholland P.J.**, Houser J.N., Maloney K.O. (2005). Stream diurnal dissolved oxygen profiles as indicators of in-stream metabolism and disturbance effects: Fort Benning as a case study. *Ecol. Indic.*, 5: 243–252.
- Nannipieri P.**, Greco S., Ceccanti B. (1990). Ecological significance of the biological activity in soil. *Soil. Biochem.*, 6: 293-355.

- Navarro-Ortega A.**, Tauler R., Lacorte S., Barcelò D. (2010). Occurrence and transport of PAHs, pesticides and alkylphenols in sediment samples along the Ebro River Basin. *J. Hydrol.*, 383: 5-17.
- Newbold J. D.**, Elwood J. W., O'Neill R. V., van Winkle W. (1981). Measuring nutrient spiralling in streams. *Can. J. Aquat. Sci.*, 38: 860-863.
- Newbold J.D.** (1992). Cycles and spirals of nutrients. *The Rivers Handbook*. P. Calow and G.E. Petts Eds. Blackwell Scientific, Oxford, UK, 370-408.
- Oades J. M., Jenkinson D. S.** (1979). A method for measuring adenosine triphosphate in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 11: 193-199.
- Packard T. T.** (1971). The measurement of respiratory electron transport activity in marine phytoplankton. *J. Mar. Res.*, 29: 235-244.
- Pagni R.M., Sigman M.E.** (1999). The photochemistry of PAHs and PCBs in water and on solids. In Boule, P. (ed.): *The Handbook of Environmental Chemistry, Part L, Environmental Photochemistry*. Springer, Berlin, 2: 139-179.
- Porter K. G., Feig Y. S.** (1980). The use of DAPI for indentifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 943-948.
- Puddu A.**, Zoppini A., Fazi S., Rosati M., Amalfitano S., Magaletti E. (2003). Bacterial uptake of DOM released from P-limited phytoplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 46: 257-268.
- Qiu, S., McComb A. J. (1995).** The plankton and microbial contribution to phosphorus release from fresh and air-dried sediments. *Mar. Freshwater Res.*, 46: 1039-1045.
- Raina M. M.**, Ian L. P., Charles P. G. (2009). Environmental Microbiology. *Second Edition*, Academic of Press.
- Raubuch M.**, Dyckmans J., Joergensen R. G., Kreutzfeldt M. (2002). Relation between respiration, ATP content, and Adenylate Energy Charge (AEC) after incubation at different temperatures and after drying and rewetting. *J. Plant. Nutr. Soil. Sci.*, 165: 435-440.
- Ravelet C.**, Krivobok S., Sage L., Steiman R. (2000) Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere*, 40: 557-563.
- Ravikrishna R.**, Valsaraj K. T., Yost S., Price C. B., Brannon J. M., Hazard J. (1998). Air emissions from exposed sediments and contaminated dredged materials. 2. Diffusion from laboratory-spiked and aged field sediments. *J. Hazard. Mater.* 60(1):89-104.
- Raymond P. A.** (2005). Carbon cycle: the age of the Amazon's breath. *Nature*, 436: 469-470.
- Relexans J. J.** (1996). Measurement of the respiratory electron transport system (ETS) activity in marine sediments: state of the art and interpretation. I. Methodology and review of literature data. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 136: 277-287.

- Renner R., (1997)** European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environ. Sci. Technol.*, 31:316A–320A.
- Richey J. E. (2004).** Pathways of atmospheric CO₂ through fluvial systems. In: Fields C (ed) Toward CO₂ stabilization issues, strategies, and consequences. A SCOPE GCP rapid assessment project. *Island Press, Washington, DC*, 329-340.
- Rickwood A. M. K.,** Thomas D. G., Philp N. H., Spicer R. D. (1982). Assessment of Congenital Neurovesical Dysfunction by Combined Urodynamic and Radiological Studies. *Brit. J. Urol.*, 5: 512-518.
- Robinson C.,** Archer S., Williams P. J. (1999). Microbial dynamics in coastal waters of East Antarctica: plankton production and respiration. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 180: 23-36.
- Robinson C.,** Widdicombe C. E., Zubkov M. V., Tartan G. A., Miller A. E., Rees A. P. (2002). Plankton community respiration during a coccolithophore bloom. *Deep-sea Res. II*, 49: 2929-2950.
- Rochkind-Dubinsky M. L.,** Sayler G. S., Blackburn J. W. (1987). Metabolism of nonchlorinated aromatic compounds. *Laskin AI (Ed) Microbiology series M. Dekker, Inc., New York*, 18: 68-70.
- Rogers S. W.,** Moorman T. B., Ong S. K. (2007). Fluorescent in situ hybridization and microautoradiography applied to ecophysiology in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 71: 620-631.
- Romanì A. M.,** Butturini A., Sabater F., Sabater S. (1998). Heterotrophic metabolism in a forest stream sediment: surface versus subsurface zones. *Aquat. Microb. Ecol.*, 16: 143-151.
- Romaní A. M.,** Vázquez E., Butturini A. (2006). Microbial availability and size fractionation of dissolved organic carbon after drought in a intermittent stream: biogeochemical link across the stream-riparian interface. *Microb. Ecol.*, 52:501-512.
- Romaní A. M.,** Amalfitano S., Artigas J., Fazi S., Sabater S., Timoner X., Ylla I., Zoppini A. (2012). Microbial biofilm structure and organic matter use in Mediterranean streams. *Hydrobiologia*, submitted.
- Romaní A. M., Sabater S. (1997).** Metabolism recovery of a stromatolitic biofilm after drought in a Mediterranean stream. *Archiv für Hydrobiologie*, 140: 261-271.
- Rusch A.,** Huettel M., Reimers C. E., Taghon G. L., Fuller C. M. (2003). Activity and distribution of bacterial populations in Middle Atlantic Bight shelf sand. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 44: 89–100.
- Samanta S. K.,** Singh O. V., Jain R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.*, 20(6):243-248.
- Schaeffer A. B.,** Fulton M. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science*, 77:194.

Schiller D. V., Acuna V., Graber D., Marti E., Ribot M., Sabater S., Timoner X., Tockner K. (2010). Contraction, fragmentation and expansion dynamics determine nutrient availability in a Mediterranean forest stream. *Aquat. Sci.*, 1-13.

Schimel J., Balser T. C., Wallenstein M. (2007). Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, 8: 1386-1394.

Schumm S. A. (1977). The fluvial system. *Wiley-Interscience (NY)*, 338.

Scorgie H. R. A. (1974). Studies on the food of invertebrates in the river Lambourn, with particular reference to the role of detritus in the trophic economy of the community. *Unpubl. Ph D. Thesis, Univ. of Reading*.

Selje N., Simon M. (2003). Composition and dynamics of particle-associated and free-living bacterial communities in the Weser estuary, Germany. *Aquat. Microb. Ecol.*, 30: 221-237.

Shopov A., Samanthia C., Williams, Verity P. G. (2000). Improvements in image analysis and fluorescence microscopy to discriminate and enumerate bacteria and viruses in aquatic samples. *Aquat. Microb. Ecol.*, 22: 103-110.

Simcic T., Germ M. (2009). Organic matter degradation through respiration in littoral and pelagial including profundal zones of an oligotrophic lake assessed by electron transport system activity. *Hydrobiologia*, 635:137-146.

Sirová D., Vrba J., Rejmnkov E. (2006). Extracellular enzyme activity in benthic cyanobacterial mats: comparison between nutrient-enriched and control sites in marshes of northern Belize. *Aquatic. Microb. Ecol.*, 44: 11-20.

Smith M. (1998). Coherence of microbial respiration rate and cell-specific bacterial activity in a coastal planktonic community. *Mar. Microb. Food Webs*, 16: 27-35.

Smith R., Kiara L. (2010). Anaerobic Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at a Creosote-Contaminated Superfund Site and the Significance of Increased Methane Production in an Organophilic Clay Sediment Cap. Portland States University.

Sohngen N. L. (1913). Benzin, Petroleum, Paraffinol und Paraffin als Kolhenstoff und Energiequelle fr Mikroben. *Zentrabl. Bakteriol. Parasitenkd Abt.*, 2: 37-595.

Songsten-Alpin M. S., Klotz R. L. (1995). A comparison of electron transport system activity in stream and beaver pond sediment. *Can. J. Fish. Acquatic. Sci.*, 52: 118-1326.

Stanley H. E., Fisher G. S., Grimm N. B. (1997). Ecosystem expansion and contraction in stream. Desert streams vary in both space and time and fluctuate dramatically in size. *Bioscience.*, 7:427-435.

Stormer K. (1908). Über die Wirkung des Schwefelkohlenstoffs und hnlicher Stoff auf den Boden. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Abt.*, 2, 20, 282, 1908.

Strahler A. N. (1963). The Earth Sciences. *Harper and Row, New York, NY*, 824.

- Tanghe T.**, Dhooge W., Verstraete W. (1999). Isolation of a bacterial strain able to degrade branched nonylphenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:746–751.
- Taylor G. T.**, Way J., Mary I. (2003). Scranton Planktonic carbon cycling and transport in surface waters of the highly urbanized Hudson River estuary. *Limnol. Oceanogr.*, 48(5): 1779–1795.
- Trevors J. T.**, Mayfield C. I., Inniss W. E. (1982). Measurement of Electron Transport System (ETS) Activity in soil. *Microb. Ecol.*, 8: 163-168.
- Thiele B.**, Günther K., Schwuger M. J. (1997). Alkylphenol ethoxylates: trace metals analysis and environmental behaviour. *Chem. Rev.*, 97: 3247.
- Tzoraki O.**, Nikolaos P. Nikolaidis (2007). A generalized framework for modeling the hydrologic and biogeochemical response of a Mediterranean temporary river basin. *J. Hydrol.*, 346: 112– 121.
- Tzoraki O.**, Amaxidis G., Skoulikidis N., Nikolaidis N. P. (2004). In-Stream Geochemical Processes of Temporary Rivers - Krathis River Case Study. *Conference Proceedings on Restoration and Protection of the Environment VII, June 28 - July 1, Mykonos, Greece.*
- Uehlinger U.**, Naegeli M. W. (1998). Ecosystem metabolism, disturbance, and stability in a prealpine gravel bed river. *J. N.Am. Benthol. Soc.*, 17: 165–178.
- Uehlinger U.**, Naegeli M., Fisher S. G. (2002). A heterotrophic desert stream? The role of sediment stability. *Wester N. Am. Naturalist.*, 62(4): 466–473.
- Valsaraj K. T.**, Choy B., Ravikrishna R., Reible D. D., Thibodeaux L. J., Price C. B., Brannon J. M., Myers T. E., Hazard J. (1997). Air emissions from exposed sediments and contaminated dredged material. 1. Experimental data in laboratory microcosms and mathematical modelling. *J. Hazard. Mater.*, 54(1-2):65-87.
- Vanhala P. T.**, Ahtiaiem J. H. (2006). Soil respiration, ATP content and *Photobacterium* toxicity test as indicators of metal pollution in soil. *Environm. Toxic. Water.*, 9: 115-121.
- Varanasi U.** (1989). Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *CRC PRESS*, 1-63.
- Vázquez E.** Romani A. M., Sabater F., Butturini A. (2007). Effects of the dry-wet hydrological shift on dissolved organic carbon dynamics and fate across stream-riparian interface in a mediterranean catchment. *Ecosystems*, 10:239-251.
- Verrhiest G. J.**, Clement B., Volat B., Montuelle B., Perrodin Y. (2002). Interaction between a polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and the microbial communities in a natural freshwater sediment. *Chemosphere*, 46: 187-196.
- Vezina A. F., Platt T.** (1988). Food web dynamics in the ocean. Best-estimates of flow networks using inverse methods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 42: 269-287.
- Volk T., Hoffert M. I.** (1985). Ocean carbon pumps: Analysis of relative strengths and efficiencies in ocean driven CO₂ changes, in *The Carbon Cycle and Atmospheric CO₂*

Natural Variation Archean to present, *Geophys. Monogr. Ser.*, vol.32, E. T. Sundquist and Broecker W. S. AGU eds, Washington, D. C., 99-110.

Ward J. V., Tockner K., Arscott D. B., Claret C. (2002). Riverine landscape diversity. *Freshwater. Biol.*, 47: 517-539.

Webster J. R., Patten B. C. (1979). Effect of watershed perturbation on stream potassium and calcium dynamics. *Ecol. Monog.*, 49: 51-72.

White J. C., Quiñones-Rivera A., Alexander M. (1998). Effect of wetting and drying on the bioavailability of organic compounds sequestered in soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 2378.

Wilhite D. A. (2000). Drought as a natural hazard: Concepts and definition. In: *Drought as a global assessment Vol 1 Wilhite (ed.) Routledge, New York 1-18.*

Wilczek S., Fischer H., Brunke M., Pusch M. T. (2004). Microbial activity within a subaqueous dune in a large lowland river (River Elbe, Germany). *Aquat. Microb. Ecol.*, 36: 83–97.

Williams P. A. (1981). Genetisc of biodegradation. In: *Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds*, Leisinger T., Hutter R., Cook A. M., and Nuesh J., Eds., Academic Press, New York, 97.

Wobus A., Bleul C., Maassen S., Sheerer C., Schuppler M., Jacobs E., Röske I. (2003). Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 46: 331–347.

Wotton R. S. (1990). Biology of the Particles in Aquatic Systems. *CRC Press. Boca Raton, FL.*

Wu P., Wood R., Ridley J., Lowe J. (2010). Temporary acceleration of the hydrological cycle in response to a CO₂ rampdown. *Geophys. Res. Lett.*, 37: 1-5.

Yager P. L., Connelly T. L., Mortazavi B., Wommack K. E., Bano N., Bauer J. E., Opsahl S., Hollibaugh J. T. (2001). Dynamic bacterial and viral response to an algal bloom at sub-zero temperatures. *Limnol. Oceanogr.*, 46: 790-801.

Ying G. G., Williams B., Kookana R., (2002) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environ. Int.*, 28:215–226.

Ylla I., Sanpera-Calbet I., Vázquez E., Romaní A. M., Munõz I., Butturini A., Sabater S. (2010). Organic matter availability during pre- and post-drought periods in a Mediterranean stream. *Hydrobiologia*, 657:217–232.

Young S. A., Kovalak W. P., Del Signore K. A. (1978). Distances travelled by autumn-shed leaves introduced into a woodland stream. *Am. Midl. Nat.*, 100: 217-222.

Young J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: *Biological Nitrogen Fixation*. G. Stacey, R.H. Burris, and H.J. Evans Eds. Chapman and Hall, New York, 43-86.

Yuan S. Y., Yu C. H., Chang B. V. (2004). Biodegradation of nonylphenol in river sediment. *Environ. Pollut.*, 127:425–430.

Yunker M. B., Macdonald R. W. R. W., Vingarzan R. R., Mitchell R. H. R. H., Goyette D. D., Sylvestre S. S. (2002). PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.*, 33:489-515.

Xu J., Yu Y., Wang P., Guo W., Dai S., Sun H. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface sediments from Yellow River, China. *Chemosphere. Elsevier Science* 1408-1414.

Zoppini A., Di Rado B., Barra Carracciolo A. (2002). Conta diretta dell'abbondanza microbica (DAPI). In: *Notiziario dei Metodi Analitici, Suppl. a Quaderni, a cura di L. Campanella, S. Capri, A. Liberatori, R. Pagnotta. IRSA-CNR, Roma*, 100:1-5

Zoppini A., Amalfitano S., Fazi S., Puddu A. (2010). Dynamics of a benthic microbial community in a riverine environment subject to hydrological fluctuations (Mulargia River, Italy). *Hydrobiologia*, 657: 37-51.

Zoppini A., Azzarro M., Del Negro P., La Ferla R., Pugnetti A. (2010b). Respirazione planctonica. In: *Metodologie di studio del plankton marino, Manuali e Linee Guida. Editore da: G. Socal, I. Buttino, M. Cabrini, O. Mangoni, A. Penna, C. Totti, ISPRA – SIBM, Roma*, 56:185-194.

Zoppini A., Azzaro F. (2010). Stima della biomassa totale da misure di ATP cellulare. In: *Metodologie di studio del plankton marino, Manuali e Linee Guida. Editore da: G. Socal, I. Buttino, M. Cabrini, O. Mangoni, A. Penna, C. Totti, ISPRA – SIBM, Roma*, 56: 421-424.

Zoppini A., Marxsen J. (2011). Importance of Extracellular Enzymes for Biogeochemical Processes in Temporary River Sediment during Fluctuating Dry-Wet Conditions. In: *Soil Enzymology, Soil Biology Series*, G. Shukla G. e A. Varma Editors, *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg*, 22: 103-117.

Zoppini A., Puddu A., Fazi S., Rosati M., Sist P. (2005) Extracellular enzyme activity and dynamics of bacterial community in mucilaginous aggregates of the northern Adriatic Sea. *Sc. Tot. Environ.*, 353:270-286.

Zwart G., Crump B. C., Agterveld Miranda P. K., Hagen F., Han Suk-Kyun (2002). Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and river. *Aquat. Microb. Ecol.*, 28: 141-155.

Zwisler W., Selje N., Simon M. (2003). Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.*, 31: 211–225.